

## 明 細 書

### シロ-イノシトールの製造方法

#### 技術分野

[0001] 本発明は、微生物変換によってミオ-イノシトールからシロ-イノシトールを製造する方法に関する。

本発明はまた、新規な $\text{NAD}^+$ 非依存型ミオ-イノシトール2-デヒドロゲナーゼ及びその製造方法に関する。本発明はまた、 $\text{NAD}^+$ 非依存型ミオ-イノシトール2-デヒドロゲナーゼ活性を指標としたシロ-イノソース製造用微生物のスクリーニング方法に関する。本発明はさらに、 $\text{NAD}^+$ 非依存型ミオ-イノシトール2-デヒドロゲナーゼ又は該酵素の高活性株を用いたシロ-イノソース及びシロ-イノシトールの製造方法に関する。

本発明はまた、新規酵素シロ-イノシトールデヒドロゲナーゼ及び、当該酵素を利用したシロ-イノシトールの製造方法に関する。更に詳しくは、シロ-イノシトールとシロ-イノソース間の酸化還元反応を触媒し、 $\text{NADH}$ または $\text{NADPH}$ 存在下で、シロ-イノソースを立体特異的にシロ-イノシトールへ還元する新規酵素シロ-イノシトールデヒドロゲナーゼ及び、当該酵素を利用したシロ-イノシトールの製造方法に関する。

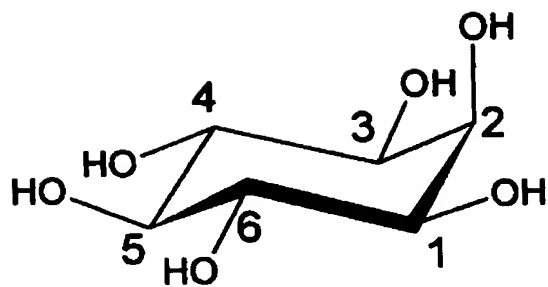
本発明はさらに、シロ-イノシトール及びシロ-イノシトール以外の中性糖を含有する混合液から、シロ-イノシトールを効率良く製造する方法に関する。

シロ-イノシトールはアルツハイマー病の治療薬や、生理活性物質の合成原料、液晶化合物の合成原料として利用することができる。

#### 背景技術

[0002] ミオ-イノシトールは次の立体構造式(A)

[化1]

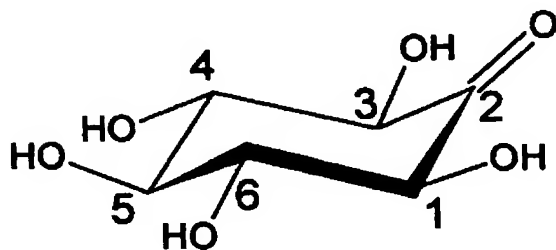


(A)

で表される天然に産する既知の物質である。

[0003] また、シロ-イノソースは次の立体構造式(B)

[化2]

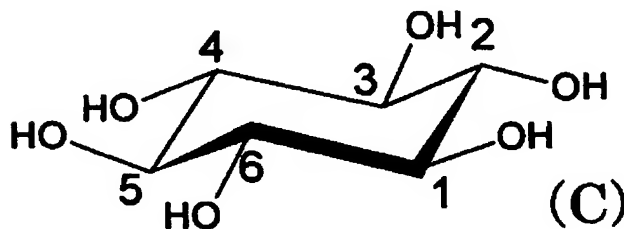


(B)

で表される既知の物質である。

[0004] さらに、シロ-イノシトールは次の立体構造式(C)

[化3]



(C)

で表される既知の化合物である。

[0005] シロ-イノシトールはミオ-イノシトールの立体異性体の一つで動物・植物中に広く見出される物質である。また、シロ-イノソースはミオ-イノシトールの2位のアキシャル

水酸基が酸化された構造を有する化合物であり、これも天然物として普遍的に存在する。

[0006] シローイノシトールはアルツハイマー病の治療薬(非特許文献1参照)や、生理活性物質の合成原料(特許文献1参照)、液晶化合物の合成原料(特許文献2参照)としての用途が期待されている物質である。

[0007] 化学合成的手法でシローイノソースまたはシローイノシトールの製法としては、(i)ヘキサヒドロキシベンゼンをラネーニッケルで還元し、シローイノシトールを得る方法(非特許文献2参照)、(ii)グルコフラノース誘導体から5段階の反応でシローイノソースを得て還元し、シローイノシトールを得る方法(非特許文献3参照)、(iii)シス-トリオキサ-トリス-ホモベンゼンを原料に4段階以上の反応でシローイノシトールを得る方法(非特許文献4参照)、(iv)ミオーイノシトールを白金触媒で酸化しシローイノソースを得、続いてエステル化したのち還元と加水分解を行って、シローイノシトールを得る方法(特許文献2参照)等がある。

[0008] また、微生物を用いてミオーイノシトールをシローイノシトールへ変換する方法としては、アグロバクテリウム属細菌を用いる方法が知られている(特許文献3参照)。しかし、この方法では、シローイノシトールの収率は低く、他の変換物も生じるために、工業的規模では利用できない。

一方、アセトバクター属細菌(非特許文献5参照)は、ミオーイノシトールに作用して、酸素を吸収し、シローイノソースへ酸化することが知られているが、詳細なメカニズムは検討されていない。

[0009] ミオーイノシトールをシローイノソースへ酸化する酵素(ミオーイノシトール2-デヒドロゲナーゼ)は動物・藻類・酵母・細菌等多くの生物種からの報告があり、自然界に広く存在する酵素である。前記酵素を有する代表的な微生物種としては、エアロバクター・エアロゲネス(非特許文献6参照)、バチルス属細菌(非特許文献7又は8参照、特許文献4〜6参照)、シュードモナス属細菌等(非特許文献9又は10参照)がある。

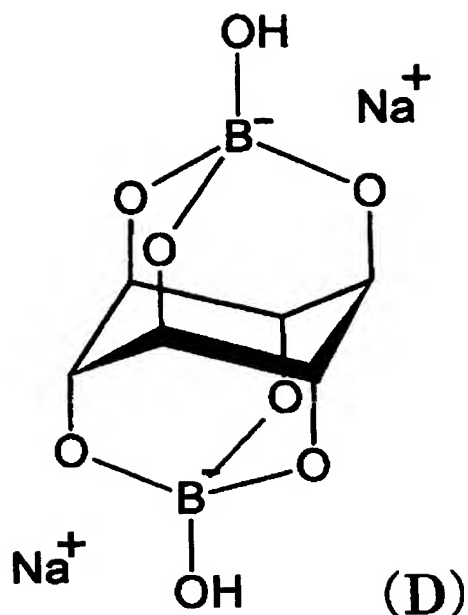
[0010] しかしながら、これらの報告におけるミオーイノシトール2-デヒドロゲナーゼは、 $\text{NAD}^+$ 依存型の酵素であり、酸化のために $\text{NAD}^+$ または $\text{NADP}^+$ を要求し、工業的規模で作用させる場合、これら補酵素をリサイクルするため、発酵生産を用いなければならず、そ

のため基質の一部が分解される、または、基質濃度を低くしなければならないなど、工業的規模における問題点があった。

- [0011] 一方、シロ-イノシトールデヒドロゲナーゼについて、ウシの脳中と、ゴキブリ脂肪組織中に存在するという報告例(非特許文献11参照)があり、この酵素はシロ-イノソースを基質として、NADPHで還元させると、シロ-イノシトールと、ミオ-イノシトールの両方が生じるとされている。しかしながら、基質特異性が低い点、また、高度な精製酵素を使用しておらず、諸性質も不明であることから、基質特異性の低いアルコールデヒドロゲナーゼである可能性があり、酵素ハンドブック(朝倉書店発行)には記載されなかった経緯を持つ。このように動物において報告例はあるものの、その真偽はさだかではない。
- [0012] また、微生物酸化により製造したシロ-イノソースを化学還元することにより、シロ-イノシトールを製造する方法も知られている(特許文献7参照)。しかしながら、シロ-イノソースの化学還元によって得られる物質はシロ-イノシトールとミオ-イノシトールの混合物であるため、混合物を脱塩精製し、さらに濃縮液から溶解度の低いシロ-イノシトールを晶析によって得るという操作が必要であった。そのため、このような方法は多くの操作を要し、シロ-イノシトールの収率という点で改善の余地があった。このような状況のもと、シロ-イノシトールを簡便に効率よく製造するために、シロ-イノソースの還元等によって得られるシロ-イノシトールとミオ-イノシトールの混合物から精製シロ-イノシトールを製造する方法の開発が望まれていた。
- [0013] 溶液中で、 $\text{NaBH}_4$ を用いてシロ-イノソースを還元した場合、反応後の溶液にはミオ-イノシトール、シロ-イノシトールの他にシロ-イノシトール・ホウ酸複合体が少量含まれる。このようなシロ-イノシトール・ホウ酸複合体については、まず、複合体を沈殿物としてろ過し、稀硫酸に溶解し、メタノールを加えて、ホウ酸と共沸させて、ホウ酸を除去し、残った溶液をイオン交換樹脂で脱塩して、シロ-イノシトールを得る方法(非特許文献12参照)が知られていた。
- [0014] このシロ-イノシトール・ホウ酸複合体は以下の立体構造式(D)で表される物質である。

[化4]





[0015] しかしながら、上記のような $\text{NaBH}_4$ を用いてシロイノソースを還元する方法においては、生じるシロイノシトール・ホウ酸複合体の割合は低く、溶液中にもシロイノシトールが生成するため、複合体と溶液成分とを分離し、それぞれからシロイノシトールを得る必要があった。さらに、複合体からシロイノシトールを得るためには、大量の有機溶媒を必要としていたため、経済性の面で改善の余地があった。従って、工業規模で簡便に且つ効率良くシロイノシトールを製造する方法が要望されていた。

特許文献1: 米国特許 第5,412,080号明細書

特許文献2: ドイツ連邦共和国特許 第3,405,663号明細書

特許文献3: 特開平9-140388号公報

特許文献4: 特開平4-126075号公報

特許文献5: 特開平05-192163号公報

特許文献6: 特開平06-007158号公報

特許文献7: 特開平2003-102492号公報

非特許文献1: 「ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー (The Journal of Biological Chemistry)」(米国)、2000年、275巻 (No.24)、p.18495-18502

非特許文献2: 「ジャーナル・オブ・ザ・アメリカン・ケミカル・ソサエティ (Journal of the American Chemical Society)」(米国)、1948年、70巻 p. 2931-2935

非特許文献3:「ジャーナル・オブ・ザ・アメリカン・ケミカル・ソサエティ(Journal of the American Chemical Society)」(米国)、1968年、90巻、p. 3289-3290

非特許文献4:「アンゲヴァント・ヒェミー(Angewandte Chemie)」(ドイツ)、1973年、85巻、p. 1110-1111

非特許文献5:「ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー(The Journal of Biological Chemistry)」(米国)、1948年、174巻、p.173-188

非特許文献6:「アーカイブズ・オブ・バイオケミストリー・アンド・バイオフィジックス(Archives of Biochemistry and Biophysics)」(米国)、1956年、J,Larner et al.、60巻、p.352-363

非特許文献7:「ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー(The Journal of Biological Chemistry)」(米国)、1979年、254巻、p.7684-7690

非特許文献8:「マイクロバイオロジー(Microbiology)」(米国)、1994年、140巻、p.2289-2298

非特許文献9:「モナトゼフテ・ヒュア・ケミ(Monatshefte fur Chemie)」(ドイツ)、1969年、100巻、p. 1327-1337

非特許文献10:「ジャーナル・オブ・バクテリオロジー(Journal of Bacteriology)」(米国)、1977年、131巻、p.872-875

非特許文献11:「バイオケミカル アンド バイオフィジカル リサーチ コミュニケーションズ」(アメリカ)、第68巻、p.1133(1976年)

非特許文献12:「ジャーナル・オブ・オルガニック・ケミストリー(Journal of Organic Chemistry)」(米国)、1958年、23巻、p.329-330

### 発明の開示

[0016] 本発明は、ミオーイノシトールから、直接に微生物変換のみで、高収量でシローイノシトールを製造する方法を提供することを課題とする。

本発明はまた、ミオーイノシトールをシローイノソースに変換する反応を触媒する新規な酵素、及びそれを用いたシローイノソース及びシローイノシトールの新規な製造方法を提供することを課題とする。

本発明はまた、シローイノシトールとシローイノソース間の酸化還元反応を触媒し、

NADHまたはNADPH存在下で、シロ-イノソースを立体特異的にシロ-イノシトールへ還元する新規酵素シロ-イノシトールデヒドロゲナーゼ、及び、当該酵素を利用したシロ-イノシトールの新規な製造方法を提供することを課題とする。

本発明はさらに、シロ-イノシトール及びシロ-イノシトール以外の中性糖を含有する混合液から、高純度のシロ-イノシトールを効率よく製造する新しい方法を提供することを課題とする。

[0017] 本発明者らは、ミオ-イノシトールからシロ-イノソースを生成する能力を有する微生物を探す研究により、自然界より分離したアセトバクター属に属する細菌(AB10253株)を発見し、この菌株を独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センターにFERM P-18868(国際寄託番号FERM BP-10136)の受託番号で寄託した。さらに、この菌株を利用し、ミオ-イノシトールからシロ-イノソースを製造する方法、および、得られたシロ-イノソースを化学還元によりシロ-イノシトールを製造する方法を確立した(特開平2003-102492号公報)。

[0018] その後、シロ-イノソースへの変換能力を上げる目的で、この菌株を変異により育種したところ、これら変異菌株の中に、ミオ-イノシトールから一旦生成したシロ-イノソースを生物的に還元し、わずかではあるがシロ-イノシトールを生成する菌株が存在することを発見した。そこで、発明者らは、この菌株について、培養変換のみでミオ-イノシトールから直接にシロ-イノシトールを主要に生成蓄積する株を得ることを目的に、さらに変異育種を行なった。その結果、目的に合致する変異菌株、すなわち、ミオ-イノシトールの酸化により生じたシロ-イノソースをシロ-イノシトールに還元し、培地中に蓄積する能力を獲得した菌株を得ることに成功した。

さらに、AB10253株よりも低い変換能力であるが、ミオ-イノシトールからシロ-イノシトールを生成する能力を有する菌株を自然界から見出し、16SrRNAの塩基配列による同定を試みたところ、アセトバクター・セルビシエ、アセトバクター・マローラム、または、バークホルデリア・アンドロポゴニスに属する微生物が見出された。

これらの微生物を用いることにより、シロ-イノシトールを効率よく製造できることを見出した。

[0019] 本発明者らはさらに、ミオ-イノシトールをシロ-イノソースに効率よく変換することの

できる酵素を取得することができれば、そのような酵素を用いることにより、高い基質濃度のミオーイノシトールからシロイノソースを効率良く製造することが可能であると考えた。また、そのような酵素の高活性株をスクリーニングにより単離することができれば、そのような菌株もシロイノソースの製造に使用することができると考えた。

そこで、本発明者らは、ミオーイノシトールからシロイノソースへ変換する反応を触媒することのできる、従来知られていない新しいタイプのNAD<sup>+</sup>非依存型のミオーイノシトール2-デヒドロゲナーゼがあるという仮説のもと、該酵素を単離すべく、鋭意研究した。その結果、アセトバクター属に属するアセトバクター・エスピーAB10253株においてNAD<sup>+</sup>非依存型のミオーイノシトール2-デヒドロゲナーゼが存在することを見出した。さらに、本発明者らは、この酵素、又はこの酵素の活性の高い微生物を使用することにより、シロイノソースを効率よく製造することができること、及び得られたシロイノソースを還元することによって高純度のシロイノシトールを効率よく製造することに成功した。

[0020] 本発明者は、次に、上記ミオーイノシトールから直接にシロイノシトールを生産する菌株の菌体中でどのようにして、ミオーイノシトールからシロイノシトールへ変換がなされているか検討したところ、ミオーイノシトールの2位の水酸基が、酸素依存で酸化され、シロイノソースになった後に、NADHまたはNADPH依存でシロイノソースをシロイノシトールへ還元する活性を有する酵素が働き、シロイノシトールが生成することを見出した。そのような活性を指標にすることによって、シロイノソースをシロイノシトールへ還元する活性を有する酵素を精製することに成功した。この酵素がNADPH依存で、シロイノソースを立体特異的にシロイノシトールへ還元する活性と、NADP<sup>+</sup>依存で、シロイノシトールをシロイノソースへ酸化する活性を有することを見出し、この酵素を「シロイノシトールデヒドロゲナーゼ」と命名した。また、本酵素はミオーイノシトールの5位の水酸基も酸化する能力を有していることから、ミオーイノシトール5-デヒドロゲナーゼと称することもできる。

[0021] さらに、大腸菌やアグロバクテリウム属、バチルス ズブチリス、キサントモナス キャネストリスのゲノムからPCR法によってシロイノシトールデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子をクローニングすることに成功した。

[0022] また、本研究者らは、本酵素が $\text{NAD}^+$ または $\text{NADP}^+$ 依存で、酸化還元反応を行なうことから、既存のミオーイノシトール2-デヒドロゲナーゼ( $\text{NAD}^+$ または $\text{NADP}^+$ 依存で、シロイノソースをミオーイノシトールへ還元する活性を有する:EC 1.1.1.18)と共役させることによって(図1:参照)、ミオーイノシトールからシロイノソースを経由して、シロイノシトールへ直接変換できると考え、これに成功した。

[0023] さらに、本発明者らは、シロイノソースの還元等によって得られる、シロイノシトール、及びミオーイノシトールなどの中性糖を含有する混合液から、効率良くシロイノシトールを製造するためには、シロイノシトール・ホウ酸複合体を形成させることが有利であると考えた。このような考えに基づいて、本研究者らは、シロイノシトールとミオーイノシトールの混合液中のシロイノシトールのみを効率良く、シロイノシトール・ホウ酸複合体に導く方法を、鋭意研究した。その結果、シロイノシトール、ホウ酸、及び金属イオンからなるシロイノシトール・ホウ酸複合体は、特異な結合を有し、他の中性糖の複合体には見られない溶解度の低い複合体であることを見出した。さらに、混合液中の溶解シロイノシトールに対して、2倍モル以上、好ましくは2〜3倍モルのホウ酸と金属塩を加え、かつ、溶液を $\text{pH}8.0\sim11.0$ 、好ましくは $\text{pH}9.0\sim10.0$ のアルカリ性に保つことにより、シロイノシトール・ホウ酸複合体が効率良く形成し、沈殿することを見出した。このような条件の下で、シロイノシトール、及びミオーイノシトールなどの中性糖を含有する混合液からシロイノシトール・ホウ酸複合体を形成させ、該複合体を酸に溶解させた後、イオン交換樹脂や水溶性有機溶媒などを用いて精製することにより、シロイノシトールを効率よく製造することに成功した。

以上によって、本発明を完成させるに至った。

[0024] すなわち、本発明は以下のとおりである。

(1) アセトバクター属またはバークホルデルシア属に属する微生物であって、ミオーイノシトールをシロイノシトールに変換する能力を有する微生物を、ミオーイノシトールを含む溶液中でミオーイノシトールに作用させることにより、シロイノシトールを前記溶液中に生成蓄積させ、該溶液中からシロイノシトールを採取することを特徴とする、シロイノシトールの製造方法。

(2) 前記ミオーイノシトールを含む溶液がミオーイノシトールを含有する液体培地で

あり、前記微生物を、該液体培地中で培養することによりミオーイノシトールに作用させることを特徴とする、(1)の製造方法。

(3) 培養により得られた前記微生物の菌体を、前記溶液中でミオーイノシトールに作用させることを特徴とする、(1)の製造方法。

(4) 前記微生物が、アセトバクター・セルビシエ、アセトバクター・マローラム、または、バークホルデリア・アンドロポゴニスに属する微生物である(1)～(3)のいずれかの製造方法。

(5) 前記微生物が、アセトバクター・エスピーAB10281株(FERM BP-10119)またはその変異株である、(1)～(3)のいずれかの製造方法。

(6) ミオーイノシトールをシローイノシトールに変換する能力を有する、アセトバクター・エスピーAB10281株(FERM BP-10119)またはその変異株。

[0025] (7) 少なくとも以下の理化学的性質を有するNAD<sup>+</sup>非依存型ミオーイノシトール2-デヒドロゲナーゼ

(a) 作用: 電子受容物質の存在下で、ミオーイノシトールから電子を奪いシローイノースを生成する反応を触媒する、

(b) 至適pH: pH4.5～5.5において活性が極大値を示す、

(c) 補因子: 1モルの酵素に1モルのヘム鉄を含有する、

(d) 阻害剤: 1mMのSn<sup>2+</sup>イオンにより酵素活性が1%以下に阻害される、

(e) サブユニット構造: 少なくとも分子量76kダルトンと46kダルトンのタンパク質を含有するヘテロマーである、

(f) 基質特異性: D-キローイノシトール、ムコイノシトール、ミオーイノシトールに反応し、D-キロー1-イノソース、L-キロー2-イノソース、シローイノソースへ、それぞれ、変換する。アローイノシトール、シローイノシトール、L-キローイノシトール、グルコースには反応しない。

(8) NAD<sup>+</sup>非依存型ミオーイノシトール2-デヒドロゲナーゼ生産能を有するアセトバクター属に属する微生物を培養し、培養された微生物の菌体から、ミオーイノシトール2-デヒドロゲナーゼを分離精製することを特徴とする、ミオーイノシトール2-デヒドロゲナーゼの製造方法。

(9) 前記微生物がアセトバクター・エスピーAB10253株 (FERM BP-10136)である、(8)の製造方法。

(10) ミオーイノシトール及び電子受容体を含む溶液中で、 $\text{NAD}^+$ 非依存型ミオーイノシトール2-デヒドロゲナーゼをミオーイノシトールに作用させてシロイノソースを生成せしめ、生成したシロイノソースを溶液中から分離精製することを特徴とする、シロイノソースの製造方法。

(11) ミオーイノシトール及び電子受容体を含む溶液中で、 $\text{NAD}^+$ 非依存型ミオーイノシトール2-デヒドロゲナーゼをミオーイノシトールに作用させてシロイノソースを生成させる工程、前記シロイノソースに還元剤を作用させてシロイノシトールを生成させる工程、及び前記シロイノシトールを分離精製する工程を含む、シロイノシトールの製造方法。

(12) アセトバクター・エスピーのAB10253株を変異処理し、得られた変異株から、 $\text{NAD}^+$ 非依存型ミオーイノシトール2-デヒドロゲナーゼ活性を指標にして選別することを特徴とする、シロイノソース製造用微生物のスクリーニング方法。

(13) 微生物を含む天然試料の中から微生物を単離し、単離された微生物から、 $\text{NAD}^+$ 非依存型ミオーイノシトール2-デヒドロゲナーゼ活性を指標にして選別することを特徴とする、シロイノソース製造用微生物のスクリーニング方法。

(14) (12)又は(13)のスクリーニング方法によって得られたシロイノソース製造用微生物を、ミオーイノシトールを含む培地で培養することにより、ミオーイノシトールからシロイノソースを生成せしめ、生成したシロイノソースを培地から分離精製することを特徴とする、シロイノソースの製造方法。

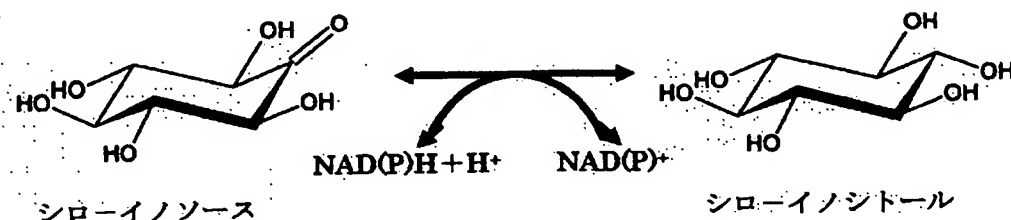
(15) (12)又は(13)のスクリーニング方法によって得られたシロイノソース製造用微生物を、ミオーイノシトールを含む培地で培養することにより、ミオーイノシトールからシロイノソースを生成させる工程、前記シロイノソースに還元剤を作用させてシロイノシトールを生成させる工程、及び前記シロイノシトールを分離精製する工程を含む、シロイノシトールの製造方法。

[0026] (16) 下記の理化学的性質を有するシロイノシトールデヒドロゲナーゼ。

反応: 下記反応式に示すように、シロイノシトールとシロイノソース間の酸化還元反

応を触媒し、NADHまたはNADPH存在下で、シロイノソースを立体特異的にシロイノシトールへ還元する。

[化5]



(17) さらに、下記の理化学的性質を有する、(16)のシロイノシトールデヒドロゲナーゼ。

- (a) 分子量および会合特性 : 38〜46kダルトン、2または3量体を形成する。
- (b) 補酵素 :  $\text{NAD}^+$ 若しくは $\text{NADP}^+$ 又は $\text{NADH}$ 若しくは $\text{NADPH}$ を補酵素とする。
- (c) 活性化重金属 :  $\text{Co}^{2+}$ イオンの存在下で活性化される。
- (d) 阻害重金属 :  $\text{Sn}^{2+}$ イオンの存在下で阻害される。
- (e) 至適pH : pH5〜9で活性を有する。

(18) 以下の(A)または(B)のタンパク質。

(A) 配列番号28に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質。

(B) 配列番号28に記載のアミノ酸配列において、1もしくは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および／または付加したアミノ酸配列を有し、シロイノシトールとシロイノソース間の酸化還元反応を触媒し、NADHまたはNADPH存在下で、シロイノソースを立体特異的にシロイノシトールへ還元する酵素活性を有するタンパク質。

(19) 以下の(A)または(B)のタンパク質をコードするDNA。

(A) 配列番号28に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質。

(B) 配列番号28に記載のアミノ酸配列において、1もしくは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および／または付加したアミノ酸配列を有し、シロイノシトールとシロイノソース間の酸化還元反応を触媒し、NADHまたはNADPH存在下で、シロイノソースを立体特異的にシロイノシトールへ還元する酵素活性を有するタンパク質。



(20) 以下の(a)または(b)のDNA。

(a) 配列番号27に記載の塩基配列のコード領域を含むDNA。

(b) 配列番号27に記載の塩基配列もしくは同塩基配列に相補的な塩基配列を有するDNAとストリジェントな条件下でハイブリダイズし、シローイノシトールとシローイノソース間の酸化還元反応を触媒し、NADHまたはNADPH存在下で、シローイノソースを立体特異的にシローイノシトールへ還元する酵素活性を有するタンパク質をコードするDNA。

(21) (19)または(20)のDNAを含むベクター。

(22) (19)もしくは(20)のDNA、または(21)のベクターを保持する形質転換微生物。

(23) 形質転換する宿主が大腸菌である(22)の形質転換微生物。

(24) (22)または(23)の形質転換微生物を培養し、培養物からシローイノシトールデヒドロゲナーゼを採取することを特徴とする、シローイノシトールデヒドロゲナーゼの製造方法。

(25) (16)のシローイノシトールデヒドロゲナーゼと、 $\text{NAD}^+$ または $\text{NADP}^+$ 存在下でミオーイノシトールを酸化しシローイノソースを生成する反応を触媒するミオーイノシトール2-デヒドロゲナーゼ(EC1.1.1.18)とを共存させた溶液中、pH6.0〜8.5で、かつ $\text{NAD}^+$ または $\text{NADP}^+$ 存在下で、ミオーイノシトールを基質として、シローイノシトールへ酵素変換反応させることを特徴とする、シローイノシトールの製造方法。

(26) 溶液中に、シローイノソースを0.01〜3%になるように添加することを特徴とする、(25)のシローイノシトールの製造方法。

(27) 溶液中に、シローイノソースを0.2〜0.5%になるように添加することを特徴とする、(25)のシローイノシトールの製造方法。

(28) 溶液中に、Co塩および／または、Mg塩を0.01〜5.0mMになるように添加することを特徴とする、(25)のシローイノシトールの製造方法。

(29) 溶液中に、Co塩および／または、Mg塩を0.2〜2.0mMになるように添加することを特徴とする、(25)のシローイノシトールの製造方法。

(30) 溶液中のミオーイノシトール濃度が5〜22%になるように調製し、酵素反応で

生成したシロイノシトールを反応溶液中で結晶化させ、シロイノシトールを系外に結晶として、ろ別することを特徴とする、(25)のシロイノシトールの製造方法。

(31) シロイノシトールデヒドロゲナーゼが以下の(A)または(B)のタンパク質である(25)の製造方法。

(A) 配列番号28に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質。

(B) 配列番号28に記載のアミノ酸配列において、1もしくは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および／または付加したアミノ酸配列を有し、シロイノシトールとシロイノソース間の酸化還元反応を触媒し、NADHまたはNADPH依存下で、シロイノソースを立体特異的にシロイノシトールへ還元する酵素活性を有するタンパク質。

(32) シロイノシトールデヒドロゲナーゼが以下の(a)または(b)のDNAによってコードされるタンパク質である(25)の製造方法。

(a) 配列番号27に記載の塩基配列のコード領域を含むDNA。

(b) 配列番号27に記載の塩基配列もしくは同塩基配列に相補的な塩基配列を有するDNAとストリジェントな条件下でハイブリダイズし、シロイノシトールとシロイノソース間の酸化還元反応を触媒し、NADHまたはNADPH依存下で、シロイノソースを立体特異的にシロイノシトールへ還元する酵素活性を有するタンパク質をコードするDNA。

(33) シロイノシトールデヒドロゲナーゼが以下の(C)または(D)のタンパク質である(25)の製造方法。

(C) 配列番号2、4、6、8、10、12または14に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質。

(D) 配列番号2、4、6、8、10、12または14に記載のアミノ酸配列において、1もしくは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および／または付加したアミノ酸配列を有し、シロイノシトールとシロイノソース間の酸化還元反応を触媒し、NADHまたはNADPH存在下で、シロイノソースを立体特異的にシロイノシトールへ還元する酵素活性を有するタンパク質。

(34) シロイノシトールデヒドロゲナーゼが以下の(c)または(d)のDNAによってコードされるタンパク質である(25)の製造方法。

(c) 配列番号1、3、5、7、9、11または13に記載の塩基配列のコード領域を含むDNA。

(d) 配列番号1、3、5、7、9、11または13に記載の塩基配列もしくは同塩基配列に相補的な塩基配列を有するDNAとストリジェントな条件下でハイブリダイズし、シロイノシトールとシロイノソース間の酸化還元反応を触媒し、NADHまたはNADPH存在下で、シロイノソースを立体特異的にシロイノシトールへ還元する酵素活性を有するタンパク質をコードするDNA。

[0027] (35) シロイノシトール及びシロイノシトール以外の中性糖を含有する混合液に、該混合液中に溶解したシロイノシトールの2倍モル以上の量のホウ酸及び金属塩を加え、かつ該混合液のpHを8.0〜11.0に調整してシロイノシトール・ホウ酸複合体を形成させる第1の工程、前記複合体を混合液から分離する第2の工程、分離した複合体を酸に溶解させてシロイノシトールとホウ酸に開裂させる第3の工程、第3の工程で得られた酸性溶液又は酸性懸濁液からシロイノシトールを単離精製する第4の工程を含む、シロイノシトールの製造方法。

(36) 前記第1の工程において、加えるホウ酸及び金属塩の量が、前記混合液中に溶解したシロイノシトールの2倍モル以上、かつ3倍モル以下であることを特徴とする、(35)の製造方法。

(37) 前記第1の工程において、前記混合液のpHを9.0〜10.0に調整することを特徴とする、(35)の製造方法。

(38) 前記金属塩が、 $\text{NaCl}$ 、 $\text{NaHCO}_3$ 、 $\text{Na}_2\text{CO}_3$ 、 $\text{Na}_2\text{SO}_4$ 、 $\text{NaHSO}_4$ 、 $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 、 $\text{Na}_3\text{PO}_4$ 、硼砂、 $\text{KCl}$ 、 $\text{KHCO}_3$ 、 $\text{K}_2\text{CO}_3$ 、 $\text{K}_2\text{SO}_4$ 、 $\text{KHSO}_4$ 、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、 $\text{K}_2\text{HPO}_4$ 、 $\text{K}_3\text{PO}_4$ 、 $\text{MgCl}_2$ 、 $\text{MgCO}_3$ 、および $\text{MgSO}_4$ からなる群より選ばれる1種または2種類以上の金属塩である、(35)の製造方法。

(39) 前記シロイノシトール及びシロイノシトール以外の中性糖を含有する混合液が、シロイノソースを含有する溶液中でシロイノソースを還元することにより得られるミオイノシトール及びシロイノシトールを含有する混合液である、(35)の製造方法。

(40) 前記第3の工程において、前記複合体を酸に溶解させて得られた溶液を0.1

規定以上の酸性に調整し、かつ、前記第4の工程において、前記酸性溶液を強酸性イオン交換樹脂、及び強塩基性イオン交換樹脂又はホウ酸選択的吸着樹脂に接触させた後、該酸性溶液からシロイノシトールを析出させることを特徴とする、(35)の製造方法。

(41) 前記第4の工程において、前記酸性溶液又は酸性懸濁液に水溶性有機溶媒を加えてシロイノシトールを析出させることを特徴とする、(35)の製造方法。

(42) 前記水溶性有機溶媒がエタノール又はメタノールであり、前記酸性溶液又は酸性懸濁液に対して、エタノールを0.3〜3倍容、又はメタノールを0.3〜5倍容加えることを特徴とする、(41)の製造方法。

(43) 前記水溶性有機溶媒がエタノール又はメタノールであり、前記酸性溶液又は酸性懸濁液に対して、エタノールを0.6〜1.5倍容、またはメタノールを0.9容〜2倍容加えることを特徴とする、(41)の製造方法。

(44) シロイノソースを含有する溶液中において、シロイノソースを水素化ホウ素金属塩を用いて還元し、ミオイノシトール及びシロイノシトールを含有する混合液を得る第1の工程、前記混合液に酸を加えて混合液中のシロイノシトール・ホウ酸複合体を溶解させ、かつ溶液を0.01規定以上の酸性溶液に調整する第2の工程、及び前記酸性溶液に、水溶性有機溶媒をミオイノシトールが析出しない量で加えて、シロイノシトールのみを析出させる第3の工程を含む、シロイノシトールの製造方法。

(45) 前記第3の工程において、加える水溶性有機溶媒がエタノール、メタノール又は1-プロパノールであり、前記酸性溶液に対して、エタノールを0.2〜0.4倍容、メタノールを0.2〜0.8倍容、又は1-プロパノールを0.2〜0.4倍容加えることを特徴とする、(44)の製造方法。

(46) 前記第3の工程において、加える水溶性有機溶媒がエタノール、メタノール又は1-プロパノールであり、前記酸性溶液に対して、エタノールを0.35〜0.45倍容、メタノールを0.45〜0.55倍容、又は1-プロパノールを0.35〜0.45倍容加えることを特徴とする、(44)の製造方法。

図面の簡単な説明

[0028] [図1]酵素の共役によるシロ-イノシトールの製造原理を示す図。

### 発明を実施するための最良の形態

[0029] 1. アセトバクター属またはバークホルデリア属に属する微生物を用いたシロ-イノシトールの製造法

本発明の一形態は、アセトバクター属またはバークホルデリア属に属する微生物であって、ミオ-イノシトールをシロ-イノシトールに変換する能力を有する微生物を、ミオ-イノシトールを含む溶液中でミオ-イノシトールに作用させることにより、シロ-イノシトールを前記溶液中に生成蓄積させ、該溶液中からシロ-イノシトールを採取することを特徴とする、シロ-イノシトールの製造方法に関する。

[0030] 当該製造方法において使用する微生物は、アセトバクター属または、バークホルデリア属に属する微生物であって、ミオ-イノシトールをシロ-イノシトールに変換する能力を有する微生物である。ここで、アセトバクター属に属する微生物としては、アセトバクター・セルビシエ (*Acetobacter cerevisiae*)、アセトバクター・マローラム (*Acetobacter malorum*)、アセトバクター・オルレアネンシス (*Acetobacter orleanensis*)、アセトバクター・インドネシエンシス (*Acetobacter indonesiensis*)、アセトバクター・オリエンタリス (*Acetobacter orientalis*)、アセトバクター・アセティ (*Acetobacter aceti*)、アセトバクター・リケファシエンシス (*Acetobacter liquefaciens*)、アセトバクター・パステウリアヌス (*Acetobacter pasteurianus*)、アセトバクター・ハンセニー (*Acetobacter hansenii*)、またはこれらの種未同定株 (エスピー) を挙げることができる。バークホルデリア属に属する微生物としては、バークホルデリア・アンドロポゴニス (*Burkholderia andropogonis*)、バークホルデリア・カリオフィリイ (*Burkholderia caryophylli*)、バークホルデリア・グラミニス (*Burkholderia graminis*) を挙げることができる。この中では、アセトバクター・セルビシエ、アセトバクター・マローラムまたは、バークホルデリア・アンドロポゴニス が特に好ましい。「ミオ-イノシトールをシロ-イノシトールに変換する能力」とは、例えば、ミオ-イノシトールを含有する培地で培養したときに該培地中にシロ-イノシトールを蓄積する能力をいう。

[0031] 上記微生物の具体例としては、アセトバクター・エスピー AB10281 株を挙げることができる。この菌株は、アセトバクター・エスピー AB10253 株 (FERM BP-10136) を変異

育種して、ミオーイノシトールをシローイノシトールに変換する能力を付与したものであり、2004年1月20日付けで、独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター(〒305-8566 日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1中央第6)にFERM P-19639の受託番号で寄託され、さらに、ブダペスト条約に基づく国際寄託に移管され、FERM BP-10119の受託番号が付与されている。

なお、アセトバクター・エスピーAB10253株は、2002年5月24日に独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター(〒305-8566 日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1中央第6)に受託番号FERM P-18868として寄託され、さらに、ブダペスト条約に基づく国際寄託に移管され、FERM BP-10136の受託番号で寄託されている。

[0032] また、上記微生物アセトバクター・エスピーAB10281株あるいは、アセトバクター・エスピーAB10253株などのアセトバクター属に属する微生物の派生株を用いることもできる。派生株は、上記微生物を変異育種して、変異が導入された株から、ミオーイノシトールを直接シローイノシトールに選択的に変換できる特性を有しているものを選択することによって得ることができる。変異育種の方法としては、例えば、UV照射、放射線照射などの物理的変異方法の他、Nニトロソグアニジン、メタンスルホン酸エチル、亜硝酸、メタンスルホン酸メチル、アクリジン色素、ベンゾピレン、硫酸ジメチルなどの変異剤の混合による化学的変異方法が例示される。

[0033] 上述したような微生物をミオーイノシトールを含む溶液中でミオーイノシトールに作用させる方法としては、まず、ミオーイノシトールを含む液体培地中で本発明の微生物を培養する方法を挙げることができる。

[0034] この場合、用いる液体培地の組成は、目的に達する限り何ら特別の制限はなく、シローイノシトールへの変換原料であるミオーイノシトールに加えて、炭素源、窒素源、有機栄養源、無機塩類等を含有する培地であればよく、合成培地・天然培地のいずれも使用できる。ミオーイノシトールを0.1%～40%、より好ましくは10%～30%添加し、炭素源としては、グリセロール、シュークロース、マルトースあるいは澱粉を0.1%～20%、より好ましくは0.3～5%、窒素源としては、酵母エキス、ペプトン、カザミノ酸、硫酸アンモニウム、塩化アンモニウム、硝酸アンモニウムあるいは尿素等を0.01%～5.0%、

好ましくは0.5%～2.0%添加するのが望ましい。その他、必要に応じ、ナトリウム、カリウム、カルシウム、マグネシウム、コバルト、マンガン、亜鉛、鉄、銅、モリブデン、リン酸、硫酸などのイオンを生成することができる無機塩類を培地中に添加することができる。培養液中の水素イオン濃度は特に調製する必要は無いが、好ましくはpH4～10、より好ましくはpH5～9に調整し培養すると、効率よくシロイノシトールを得ることができる。

- [0035] 培養条件は、培地の種類によっても異なるが、培養温度は12～35℃、好ましくは20～27℃であり、また、培養は液体培地を振とうしたり、液体培地中に空気あるいは酸素ガスを吹き込むなどして好氣的に行えば良い。本培養では、ミオーイノシトールが培養初期に、酸化されて生じたシロイノソースが、培養後期に、生体中で還元されてシロイノシトールが生じる。さらに培養を行なうと、徐々にシロイノシトールも分解される。従って、培養期間は、シロイノシトールが最大または、必要量の蓄積量を示すまで行えば良く、通常1～10日、好ましくは3～8日である。
- [0036] また、培養により得られた微生物の菌体をミオーイノシトールを含む溶液中でミオーイノシトールに作用させてもよい。ここで、培養により得られた菌体としては、微生物を別途適当な培養条件で培養して得たものを用いてもよいし、シロイノシトールの製造に用いられた微生物を培養液から分離して集めた菌体を再度用いてもよい。菌体を得るための集菌は、遠心分離、濾過など公知の方法により行えばよい。
- [0037] 上記のようにして微生物をミオーイノシトールに作用させることにより、溶液中にはシロイノシトールが蓄積する。培養液からシロイノシトールを採取する方法は、通常の水溶性中性物質を単離精製する一般的な方法を応用することができる。すなわち、培養液から菌体を除去した後、培養上清液を活性炭やイオン交換樹脂等で処理することにより、シロイノシトール以外の不純物をほとんど除くことができる。その後、再結晶等の方法を用いることにより、目的物質を単離することができる。
- [0038] より具体的には、シロイノシトールが蓄積した培養上清液を、不望成分の除去の目的で強酸性陽イオン交換樹脂、例えばデュオライト(登録商標)C-20(H<sup>+</sup>型)を充填したカラムに通過させ通過液を集め、その後このカラムに脱イオン水を通過させ洗浄して洗浄液を集め、得られた通過液及び洗浄液を合併する。こうして得られた溶液を

強塩基性陰イオン交換樹脂、例えばデュオライト(登録商標)A116(OH<sup>-</sup>型)を充填したカラムに通過させ通過液を集め、その後このカラムに脱イオン水を通過させ洗浄して洗浄液を集め、得られた通過液及び洗浄液を合併して、シロイノシトールを含みそれ以外の不純物をほとんど含まない水溶液を取得する。この水溶液を濃縮して得られたシロイノシトールの濃厚溶液に、エタノールの適当量を加え、室温または低温で一晩放置すると、純粋なシロイノシトールの結晶を晶出できる。また、シロイノシトールは水溶解性が低いことを利用して、この水溶液を濃縮し、ろ過するだけでも、純粋なシロイノシトールの結晶を晶出できる。さらに、カラム操作を行なう際に、脱色を目的として、活性炭を充填したカラムを使用することもできる。

[0039] その他の精製方法として、後述するような、培養で得られたシロイノシトールを含む溶液に、ホウ酸と、NaClを加えて、シロイノシトールホウ酸複合体を作り、これをろ別後に、酸によりホウ酸を遊離させ、メタノールのような有機溶媒を加えることで結晶化させる方法によっても、純粋なシロイノシトールの結晶を得る事ができる。

[0040] さらに、本菌株の培養中では、常温で、水溶解性が低い(溶解度約1.6%)シロイノシトールは、結晶化し、沈殿が生じる。そのため、この培養途中に、ミオーイノシトールを追加して加え、さらに、シロイノシトールを結晶として蓄積させることも可能である。

[0041] 2. 新規なNAD<sup>+</sup>非依存型ミオーイノシトール2-デヒドロゲナーゼ、ならびに該酵素を用いたシロイノソースおよびシロイノシトールの製法

本発明の他の形態は、新規なNAD<sup>+</sup>非依存型ミオーイノシトール2-デヒドロゲナーゼ、ならびに該酵素を用いたシロイノソースおよびシロイノシトールの製法に関する。

[0042] <2-1> 新規なNAD<sup>+</sup>非依存型ミオーイノシトール2-デヒドロゲナーゼ

本発明のNAD<sup>+</sup>非依存型ミオーイノシトール2-デヒドロゲナーゼは、少なくとも以下の理化学的性質を有する。

(a) 作用: 電子受容物質の存在下で、ミオーイノシトールから電子を奪いシロイノソースを生成する反応を触媒する、

(b) 至適pH: pH4.5〜5.5において活性が極大値を示す、

(c) 補因子: 1モルの酵素に1モルのヘム鉄を含有する、

(d) 阻害剤: 1mMのSn<sup>2+</sup>イオンにより酵素活性が1%以下に阻害される、



(e) サブユニット構造: 少なくとも分子量76kダルトンと46kダルトンのタンパク質を含有するヘテロマーである、

(f) 基質特異性: D-キローイノシトール、ムコイノシトール、ミオーイノシトールに反応し、D-キロー-1-イノソース、L-キロー-2-イノソース、シローイノソースへ、それぞれ、変換する。アローイノシトール、シローイノシトール、L-キローイノシトール、グルコースには反応しない。

[0043] (a) の作用は、電子受容物質の存在下で、ミオーイノシトール2-デヒドロゲナーゼ活性を測定することによって確認することができる。ここで、電子受容物質としては酸化型DCIP、PMS (フェナジンメソサルフェート)、メチレンブルー、 $\text{Fe}^{3+}$  イオン等が例示され、これらを組み合わせて使用することができるが、好ましくは酸化型DCIPが使用される。ミオーイノシトール2-デヒドロゲナーゼ活性は、例えば、100mMリン酸緩衝液 (pH 5.0)、ミオーイノシトール5mg、2, 4-ジクロロインドフェノール (酸化型DCIP) 0.4mgからなる1mL溶液における600nmの吸収度変化を反応速度に換算して、1分間あたり、 $1 \mu\text{mol}$  のミオーイノシトールが酸化される活性を1ユニットとして測定することができる。(b) の至適pHは、各pHにおいてミオーイノシトール2-デヒドロゲナーゼ活性を測定し、酵素活性が極大を示すpHの範囲を調べることによって確認することができる。また、(d) の性質は、酵素活性測定系に $\text{Sn}^{2+}$  イオンを添加して酵素活性を測定し、 $\text{Sn}^{2+}$  イオン非添加時の活性と比較することによって確認することができる。また、(e) のサブユニット構造は、例えば、SDS-PAGE (ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミド電気泳動) などによって確認することができる。なお、各サブユニットの76kダルトン及び46kダルトンという分子量はそれぞれおおよそその値であり、この前後数キロダルトンの値であつてもよい。

[0044] 本発明の $\text{NAD}^+$ 非依存型ミオーイノシトール2-デヒドロゲナーゼは、上記性質を有している限り特に限定されないが、例えば、アセトバクター・エスピーAB10253株由来のものが挙げられる。本発明の $\text{NAD}^+$ 非依存型ミオーイノシトール2-デヒドロゲナーゼの基質特異性は上述したとおりであるが、アセトバクター・エスピーAB10253株由来の酵素について、基質濃度50mMにおける相対活性及び $K_m$ 値を示すと、以下のとおりである。すなわち、D-キローイノシトール (相対活性100%、 $K_m=8.8\text{mM}$ )、ムコイノ

シトール(相対活性68%、 $K_m=14.5\text{mM}$ )、ミオイノシトール(相対活性53%、 $K_m=20\text{mM}$ )である。

[0045] 本発明の $\text{NAD}^+$ 非依存型ミオイノシトール2-デヒドロゲナーゼは、従来知られている $\text{NAD}^+$ 依存型のミオイノシトール2-デヒドロゲナーゼと異なるタイプの $\text{NAD}^+$ 非依存型ミオイノシトール2-デヒドロゲナーゼである。特に異なる点について、両酵素を比較すると、以下の表1のようになる。

[0046] [表1]

表1

	本願酵素( $\text{NAD}^+$ 非依存型)	従来型の酵素( $\text{NAD}^+$ 依存型)
細胞内局在	膜画分	細胞質可溶性画分
至適pH	pH4.5~5.5	pH8.0~9.0
電子受容体	ヘム鉄	$\text{NAD}^+$

[0047] <2-2> $\text{NAD}^+$ 非依存型ミオイノシトール2-デヒドロゲナーゼの製造法

本発明の $\text{NAD}^+$ 非依存型ミオイノシトール2-デヒドロゲナーゼの製造法は、 $\text{NAD}^+$ 非依存型ミオイノシトール2-デヒドロゲナーゼ生産能を有するアセトバクター属に属する微生物を培養し、培養された微生物の菌体から、ミオイノシトール2-デヒドロゲナーゼを分離精製することを特徴とする製造方法である。

[0048]  $\text{NAD}^+$ 非依存型ミオイノシトール2-デヒドロゲナーゼの製造に使用することのできる微生物としては、 $\text{NAD}^+$ 非依存型ミオイノシトール2-デヒドロゲナーゼ生産能を有する限り特に限定されないが、例えば、アセトバクター・エスピーAB10253(FERM BP-10136)が挙げられる。微生物を培養するために用いる培地は、従来知られる一般的な微生物培養に使用されるもので、炭素源、窒素源、その他栄養素などを含むものを使用することができる。ここで、炭素源として、グルコース、シュクロース、マルトースあるいは澱粉などが例示される。その濃度は、0.1%~20%、より好ましくは0.3~5%添加するのが望ましい。窒素源としては、ペプトン、酵母抽出物、カザミノ酸、硫酸アンモニウム、塩化アンモニウム、硝酸アンモニウム、尿素あるいは肉エキスなどが例示される。その濃度は、0.01%~5.0%、好ましくは0.5%~2.0%添加するのが望ましい。その他必要に応じ、ナトリウム、カリウム、カルシウム、マグネシウム、コバルト、マ

ンガン、亜鉛、鉄、銅、モリブデン、リン酸、硫酸などのイオンを生成することができる無機塩類を培地中に添加することが好ましい。培養液中の水素イオン濃度はpH3〜10、好ましくはpH5〜7に調整し培養すると、効率よく本酵素の発現を誘導することができる。なお、%で示した値は、w/vの百分率を示すものであり、濃度を%で表示する場合は、以下においても同様とする。

- [0049] なお、NAD<sup>+</sup>非依存型ミオ-イノシトール2-デヒドロゲナーゼの発現を誘導するために、ミオ-イノシトールを含有する培地を使用することが好ましい。この場合、加えるミオ-イノシトールの濃度は、0.2%〜15%、好ましくは1%〜5%、より好ましくは3%が適当である。
- [0050] 培養条件は、培地の種類によっても異なるが、培養温度は好ましくは12〜35℃、より好ましくは20〜27℃であり、また、培養は液体培地を振とうしたり、液体培地中に空気あるいは酸素ガスを吹き込むなどして好氣的に行うことが好ましい。培養期間は、培養液中にミオ-イノシトールが完全に消失し、且つ、シロ-イノソースが最大の蓄積量を示すまで行うことが好ましく、通常1〜10日、好ましくは3〜8日である。
- [0051] この様に培養した菌体から酵素を分離精製することにより、本発明の酵素を得ることができる。酵素の分離精製は、通常のタンパク質の精製方法と同様にして行うことができる。以下に具体例を挙げて説明するが、分離精製方法はこれらに限定されない。
- [0052] まず、培養して得られた菌体を遠心分離やフィルター過などにより沈殿又は濃縮する。次に、得られた菌体沈殿物、または菌体懸濁液を破碎する。破碎は、フレンチプレス、ダイノミール、超音波破碎などの方法が使用できるが、超音波破碎が好ましい。例えば、培養液1リットルから集められた菌体の場合、水により洗浄を行ない、最終的に50mlの水に懸濁し、この懸濁液に超音波を照射して細胞を破碎し、12000rpmの遠心分離によって、沈殿を得る。さらに得られた沈殿を、適当な緩衝液、例えば、トリス緩衝液、リン酸緩衝液（濃度は2mM〜100mM、pHはpH6.0〜8.0）に懸濁し、ここに、界面活性剤を加えることで膜酵素を抽出することができる。界面活性剤の種類としては、TritonX-100（登録商標）、Tween20（登録商標）、Tween80（登録商標）などが例示でき、その濃度は、0.02%〜1.0%で使用するが、好ましくはTritonX-100を0.6%の濃度で使用するの望ましい。

- [0053] 上記で得られた界面活性剤を加えた懸濁液を、低温で1〜5時間程度インキュベートすることにより、酵素を抽出することができる。この後、再度遠心分離を行ない、上清に可溶化してきた酵素を得ることができる。この様にして得られた酵素液は、このまま、シロイノソースの製造のために使用することもできるが、必要があれば、通常の酵素の濃縮に使用される方法により、酵素を濃縮し、使用することができる。酵素の濃縮方法として、例えば、硫酸分画、限外ろ過などが例示される。また、より高度に精製するためには、さらに以下の処理を行うことが好ましい。
- [0054] 可溶化した酵素は、カラムクロマトグラフィー精製を行うことが好ましい。カラムクロマトグラフィーとしては、DEAEカラムクロマトグラフィーなどが挙げられる。DEAEカラムは、DEAE基を有していれば、特に担体の性状が異なっても使用できる。好ましくはDEAEトヨパール(東ソー社製)が例示される。DEAEトヨパールを用いて精製する場合、上述した酵素液は、塩強度20mMに調製して、カラムに加えるとよい。その様にしてカラムに吸着させたタンパク質は次に、界面活性剤を含まない20mMの緩衝液(pHはpH6.0〜8.0)に、NaCl、またはKClの直線濃度勾配をかけた溶液を通過させ、タンパク質を溶出させる。NaClの場合0mMから、500mMの濃度勾配、KClの場合、0mMから350mMの濃度勾配が使用される。次に、このカラムを、再度、界面活性剤を含まない20mMの緩衝液(pHはpH6.0〜8.0)を通して、洗浄し、次に界面活性剤を含む20mMの緩衝液(pHはpH6.0〜8.0)に、NaCl、またはKClの直線濃度勾配をかけた溶液を通過させ、タンパク質を溶出させる。NaClの場合0mMから、500mMの濃度勾配、KClの場合、0mMから350mMの濃度勾配が使用される。添加される界面活性剤は、TritonX-100、Tween20、Tween80などが例示でき、その濃度は、0.02%〜1.0%で利用できるが、好ましくはTritonX-100を0.1%の濃度で使用するのが望ましい。このような条件の中で、本酵素は、界面活性剤を含む20mM緩衝液に100〜170mMのNaClを含む溶液によって、カラムから溶出される。この様にして得られた酵素液は、このまま、シロイノソースの製造のために使用することもできるが、より高度に精製するためには、さらに処理がなされる。
- [0055] なお、酵素活性を指標にして精製する場合、酵素活性の測定は、例えば、タンパク溶液を100mMリン酸緩衝液(pH5.0)、ミオ-イノシトール5mg、2、4-ジクロロインドフ

エノール(酸化型DCIP) 0.4mgからなる1ml溶液に加え、600nmの吸収度変化を反応速度に換算して、1分間あたり、1  $\mu$  molのミオーイノシトールが酸化される活性を1ユニットとして測定することができる。

- [0056] 本酵素をさらに精製する場合、本酵素液を透析や、限外ろ過により脱塩した後に、例えば、ヒドロキシアパタイトカラムに加えることが好ましい。この場合、ヒドロキシアパタイトカラムに吸着したタンパク質は、界面活性剤を含むリン酸緩衝液(pH7.0)の直線濃度勾配をかけた溶液を通過させることによって溶出される。この時使用されるリン酸緩衝液の濃度勾配は0mMから500mMの濃度勾配が使用される。また、添加される界面活性剤は、TritonX-100、Tween20、Tween80などが例示でき、その濃度は、0.02%～1.0%で利用できるが、好ましくはTritonX-100を0.1%の濃度で使用するの望ましい。このような条件の中で、本酵素は、界面活性剤を含む210～260mMのリン酸緩衝液によって、カラムから溶出される。この様にして得られた酵素液は、ほぼ、純粋なNAD<sup>+</sup>非依存ミオーイノシトール2-デヒドロゲナーゼを含んでおり、このまま、シロイノソースの製造のために使用することができる。

[0057] <2-3>シロイノソース製造用微生物のスクリーニング方法

本発明はまた、アセトバクター・エスピーのAB10253株を変異処理し、得られた変異株から、NAD<sup>+</sup>非依存型ミオーイノシトール2-デヒドロゲナーゼ活性を指標にして選別することを特徴とする、シロイノソース製造用微生物のスクリーニング方法に関する。

- [0058] ここで、指標となるNAD<sup>+</sup>非依存型ミオーイノシトール2-デヒドロゲナーゼ活性の測定は、例えば、微生物菌体から得られた膜画分を100mMリン酸緩衝液(pH5.0)、ミオーイノシトール5mg、2,4-ジクロロインドフェノール(酸化型DCIP) 0.4mgからなる1mL溶液に加え、600nmの吸収度変化を測定することによって行うことができる。選別の基準としては、例えば、上記方法で活性を測定して比較した場合に、非変異AB10253株の1.2倍以上、好ましくは2倍以上のNAD<sup>+</sup>非依存型ミオーイノシトール2-デヒドロゲナーゼ活性を示す菌株を選別することが好ましい。

- [0059] アセトバクター・エスピーAB10253株を変異処理する方法は、通常の微生物の変異方法が使用できる。例えば、UV照射、放射線照射などの物理的変異方法の他、Nニトロソグアニジン、メタンスルホン酸エチル、亜硝酸、メタンスルホン酸メチル、アクリジ

ン色素、ベンゾピレン、硫酸ジメチルなどの変異剤の混合による化学的変異方法が例示される。

- [0060] これらの変異処理を施したアセトバクター・エスピーから、シロイノソース製造用微生物をスクリーニングする方法を以下に例示する。ただし、スクリーニング方法は、 $\text{NAD}^+$ 非依存型ミオーイノシトール2-デヒドロゲナーゼ活性を指標にして行う限り、この方法に限定されない。
- [0061] 変異処理したAB10253株を、ミオーイノシトールと栄養成分を含有する寒天培地に、9cm径のシャーレ1枚当たり、10〜300コロニー、好ましくは100〜150コロニーが形成する様に広げる。ここで、培地の栄養成分として加えられる炭素源、窒素源、その他栄養素としては、従来知られる一般的な微生物培養に使用されるものが使用可能である。例えば、炭素源として、グルコース、シュクロース、マルトースあるいは澱粉などが例示される。その濃度は、0.1%〜20%、より好ましくは0.3〜5%添加するのが望ましい。窒素源としては、ペプトン、酵母抽出物、カザミノ酸、硫酸アンモニウム、塩化アンモニウム、硝酸アンモニウム、尿素あるいは肉エキス、などが例示される。その濃度は、0.01%〜5.0%、好ましくは0.5%〜2.0%添加するのが望ましい。
- [0062] その他必要に応じ、ナトリウム、カリウム、カルシウム、マグネシウム、コバルト、マンガ、亜鉛、鉄、銅、モリブデン、リン酸、硫酸などのイオンを生成することができる無機塩類を培地中に添加することが有効である。培養液中の水素イオン濃度はpH3〜10、好ましくはpH5〜7に調整し培養すると、効率よく本酵素を誘導することができる。
- [0063] 培養はコロニーが十分形成する時間、培養すれば良く、約3日でコロニーが形成する。培養温度は、好ましくは菌の生育適温である25〜30℃、より好ましくは27℃で培養される。
- [0064] コロニーは単離培養し、個々に、 $\text{NAD}^+$ 非依存ミオーイノシトール2-デヒドロゲナーゼ活性を測定し、活性の強い株を選抜することもできるが、以下に述べる様に、9cm径のシャーレを用いて、寒天培地の上で効率良く、選抜することができる。
- [0065] 培養後、9cm径のシャーレに形成したコロニーの上に、検定用寒天培地を10mlゆっくりと注ぎ入れる。検定用寒天培地の組成は、100mMリン酸緩衝液、1%ミオーイノシトール、0.4%酸化型DCIPからなる組成に0.5%寒天になるように寒天を加えて、寒

天を溶解後、36℃まで冷却し、寒天が固まらない様に調製した粘濁な溶液である。このような処理を行なった検定用寒天培地は、27℃でゆっくりと冷却され、9cm径のシャーレに形成したコロニーの上に、重層された形で、固化する。

[0066] 処理後、27℃で、シャーレをインキュベートすることにより、徐々にNAD<sup>+</sup>非依存ミオ-イノシトール2-デヒドロゲナーゼ活性の大きさに従って、寒天培地上に一面に広がった酸化型DCIPの青色が、コロニーのまわりのみ、透明になり始めるのが観察される。この時、より速く、透明になった所のコロニーを新しい培地に継代し、NAD<sup>+</sup>非依存ミオ-イノシトール2-デヒドロゲナーゼ活性の高い株を取得することができる。

[0067] また、ここで得られたシロ-イノソース生産微生物に、さらに変異処理を施し、酸素呼吸能力を指標にしてスクリーニングを行うことにより、酸素を電子受容体として、ミオ-イノシトールをシロ-イノソースに変換する能力を持った菌株を育種することが可能である。ここで、酸素呼吸能力とは低酸素条件でよく生育する能力をいい、低酸素条件とは、例えば酸素濃度3%以下の条件をいう。アセトバクター・エスピーAB10253株は絶対好気性菌なので、低酸素条件でよく生育するコロニーを新しい培地に継代することで酸素呼吸能力の高い菌株を得ることができる。

[0068] さらに、上記のスクリーニング方法は、天然の微生物に対しても行うことができる。すなわち、本発明のもう一つのスクリーニング方法は、微生物を含む天然試料の中から微生物を単離し、単離された微生物から、NAD<sup>+</sup>非依存型ミオ-イノシトール2-デヒドロゲナーゼ活性を指標にして選別することの特徴とするスクリーニング方法である。ここで、天然の微生物を含む試料とは、例えば、天然の土壌等が挙げられる。天然試料の中から微生物を単離する方法は、例えば、天然試料の懸濁液又はその希釈液を寒天培地に塗布し、天然試料に含まれる微生物を独立のコロニーとして寒天培地上に生育させる方法等が挙げられる。単離された微生物の中からシロ-イノソース製造用微生物をスクリーニング方法は、培地のpHを3-4、好ましくは3.5にする点を除いて、アセトバクター・エスピーAB10253株を用いる場合と同様の操作が適用できる。

[0069] <2-4>シロ-イノソースの製造方法

本発明はまた、ミオ-イノシトールに、NAD<sup>+</sup>非依存ミオ-イノシトール2-デヒドロゲナーゼ又は同酵素の高活性株(シロ-イノソース製造用微生物)を作用させることを特

徴とする、シロイノソースの製造方法に関する。

[0070] (i)  $\text{NAD}^+$ 非依存ミオーイノシトール2-デヒドロゲナーゼを用いたシロイノソースの製造方法

本発明の「 $\text{NAD}^+$ 非依存型ミオーイノシトール2-デヒドロゲナーゼを用いたシロイノソースの製造方法」は、 $\text{NAD}^+$ 非依存型ミオーイノシトール2-デヒドロゲナーゼをミオーイノシトール及び電子受容体を含む溶液中でミオーイノシトールに作用させてシロイノソースを生成せしめ、生成したシロイノソースを溶液中から分離精製することの特徴とする製造方法である。ここで $\text{NAD}^+$ 非依存型ミオーイノシトール2-デヒドロゲナーゼは、既述した方法によって得られるものを使用することができる。なお、本酵素はミオーイノシトールからシロイノソースを生成する活性を有する限り、その精製の程度は問わない。

[0071] ここで、基質であるミオーイノシトールは0.1%～20%、好ましくは、5%～10%の濃度で使用する。本反応に使用される酵素液は、上述した粗酵素液、または高度に精製された酵素液を使用することができる。反応時のpHは、好ましくはpH5.0に保たれる様にし、pHをモニターして、アルカリ性溶液、または、酸性溶液を適時、添加できる他、適当な緩衝液を使用することができる。緩衝液の例としては、pH5.0付近で緩衝能力のあるものであれば特に限定されずに使用することができ、好ましくはリン酸緩衝液が使用される。

[0072] この酵素を用いる製造方法においては、反応液中に電子受容物質を加える必要がある。ここで、電子受容物質としては酸化型DCIPの他、PMS(フェナジンメソサルフェート)、メチレンブルー、 $\text{Fe}^{3+}$ イオン等が例示され、これらを組み合わせて使用することができるが、好ましくは酸化型DCIPが使用される。加えられる電子受容物質の量はミオーイノシトール1モルに対して、1モルの量が必要であり、これを相当するミオーイノシトールのモル数に対して適時加えることができる。反応が進むに従い、これら電子受容物質の濃度が高くなる時、還元型電子受容物質が析出することがあるが、その場合は、遠心分離、またはろ過などの操作により、除去することができる。本反応は電子受容物質の溶解度により、不均一系である場合があり、攪拌下に反応を行なうことが好ましい。



[0073] 本反応の反応温度は、酵素が失活しない程度で作用させるのであれば、特に限定されないが、好ましくは20℃～40℃で作用させることができる。反応時間は好ましくは1～72時間であり、より好ましくは8～12時間である。生成したシロイノソースは、例えば再結晶法などによって分離精製することができる。

[0074] (ii) 微生物を用いたシロイノソースの製造方法

本発明はまた、上記スクリーニング方法によって得られるシロイノソース製造用微生物を、ミオイノシトールを含有する培地で培養することにより、ミオイノシトールからシロイノソースを生成せしめ、生成したシロイノソースを培地から分離精製することを特徴とする、微生物を用いたシロイノソースの製造方法に関する。

[0075] ここで用いる液体培地の組成は、微生物がミオイノシトールからシロイノソースを生成できる限り何ら特別の制限はなく、例えばシロイノソースへの変換原料であるミオイノシトールに加えて、炭素源、窒素源、有機栄養源、無機塩類等を含有する培地を挙げることができる。合成培地・天然培地のいずれも使用できる。具体的には、ミオイノシトールを0.1%～40%、より好ましくは10%～30%添加し、炭素源としては、グリセロール、シュクロース、マルトースあるいは澱粉を0.1%～20%、より好ましくは0.3～5%、窒素源としては、酵母エキス、ペプトン、カザミノ酸、硫酸アンモニウム、塩化アンモニウム、硝酸アンモニウムあるいは尿素等を0.01%～5.0%、好ましくは0.5%～2.0%含有する培地が望ましい。

[0076] その他必要に応じ、ナトリウム、カリウム、カルシウム、マグネシウム、コバルト、マンガ、亜鉛、鉄、銅、モリブデン、リン酸、硫酸などのイオンを生成することができる無機塩類を培地中に添加することが有効である。培養液中の水素イオン濃度はpH4～10、好ましくはpH5～9に調整し培養すると、効率よくシロイノソースを得ることができる。

[0077] 培養条件は、菌株や培地の種類によっても異なるが、培養温度は好ましくは12～35℃、より好ましくは20～27℃であり、また、培養は液体培地を振とうしたり、液体培地中に空気あるいは酸素ガスを吹き込むなどして好氣的に行うことが好ましい。培養期間は、培養液中にミオイノシトールが完全に消失し、且つ、シロイノソースが最大の蓄積量を示すまで行うことが好ましく、通常1～10日、好ましくは3～8日である。

[0078] 培養液から目的物を分離精製する方法は、通常の水溶性中性物質を分離精製する一般的な方法を応用することができる。例えば、培養液から菌体を除去した後、培養上清液を活性炭やイオン交換樹脂等で処理することにより、シロイノソース以外の不純物をほとんど除くことができる。ただし、強塩基性陰イオン交換樹脂のOH<sup>-</sup>型はシロイノソースを化学変化させるので使用しないほうが好ましい。その後、再結晶等の方法を用いることにより、目的物質を単離することができる。

[0079] 以下にシロイノソースの分離精製の具体的方法を例示する。ただし、分離精製の方法は、これらに限定されない。まず、シロイノソースが蓄積した培養上清液を、不望成分の除去の目的で強酸性陽イオン交換樹脂、例えばデュオライト(登録商標)C-20(H<sup>+</sup>型)(住友化学製)を充填したカラムに通過させ通過液を集め、その後このカラムに脱イオン水を通過させ洗浄して洗浄液を集め、得られた通過液及び洗浄液を合併する。こうして得られた溶液を弱塩基性陰イオン交換樹脂、例えばデュオライト(Duolite:登録商標)A368S(遊離塩基型)を充填したカラムに通過させ通過液を集め、その後このカラムに脱イオン水を通過させ洗浄して洗浄液を集め、得られた通過液及び洗浄液を混合して、シロイノソースを含みそれ以外の不純物をほとんど含まない水溶液を取得する。この水溶液を濃縮して得られたシロイノソースの濃厚溶液に、エタノールの適当量を加え、室温または低温で一晩放置すると、純粋なシロイノソースの結晶を晶出できる。

[0080] <2-5>シロイノシトールの製造法

本発明はまた、NAD<sup>+</sup>非依存型ミオーイノシトール2-デヒドロゲナーゼ又は該酵素の高活性株を用いてミオーイノシトールからシロイノソースを生成させ、得られたシロイノソースを還元してシロイノシトールを得る事を特徴とする、シロイノシトールの製造方法に関する。

[0081] この製造方法において、NAD<sup>+</sup>非依存型ミオーイノシトール2-デヒドロゲナーゼ又は該酵素の高活性株(シロイノソース製造用微生物)を用いてミオーイノシトールからシロイノソースを生成させる工程は、既述した方法によって行うことができる。この工程によって得られるシロイノソースは、単離精製して還元工程に用いてもよいが、単離精製せずに還元工程に用いてもよい。シロイノソース製造用微生物を用いてシロ-

イノソースを生成させる場合、培養液中にシロイノソースを生成蓄積させた後、シロイノソースを単離せず、菌体のみを分離して得た培養ろ液を還元工程に用いてもよい。

[0082] 反応液系中でシロイノソースをシロイノシトールに還元できる還元剤としては、特に限定されないが、例えば、水素化ホウ素ナトリウム、水素化ホウ素リチウム、水素化ホウ素カリウム、水素化トリメトキシホウ素ナトリウム、シアン化水素化ホウ素ナトリウムが挙げられる。これらの還元剤によりシロイノソースを還元すると、シロイノシトール及びミオイノシトールが生成する。その生成比率は反応温度、還元試薬の種類によって異なるが、一般的にはシロイノシトール:ミオイノシトール＝約4:6の混合物が得られる。したがって、混合物からシロイノシトールを分離精製する必要がある。

[0083] なお、シロイノソースからシロイノシトールへの還元は、後述するような、本発明が提供する新規シロイノシトールデヒドロゲナーゼを用いて行ってもよい。

[0084] 還元反応液からシロイノシトールを分離精製するには、通常の水溶性中性物質を単離精製する一般的な方法を応用することができる。例えば、まず、反応液を活性炭やイオン交換樹脂等で処理することにより、シロイノシトール及びミオイノシトールを含みそれ以外の不純物をほとんど含まない水溶液を得る。この水溶液からシロイノシトールだけを取得するには、主に水に対する溶解度の差を利用することが有効である。すなわち、前記の水溶液を濃縮し、水に対する溶解度の低いシロイノシトールを固体として析出せしめこれを取得する方法などを使用することができる。

また、後述するように、得られたシロイノシトールを含む溶液に、ホウ酸と、NaClを加えて、シロイノシトールホウ酸複合体を作り、これをろ別後に、酸によりホウ酸を遊離させ、メタノールのような有機溶媒を加えることで結晶化させる方法によって、シロイノシトールを分離精製してもよい。

[0085] 3. シロイノシトールデヒドロゲナーゼ及びこれを用いたシロイノシトールの製法

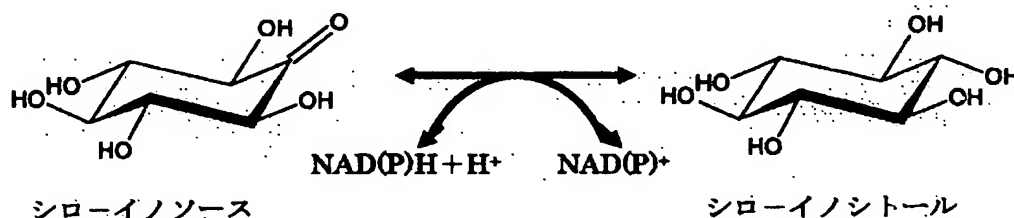
本発明の他の形態は、新規酵素シロイノシトールデヒドロゲナーゼ、ならびに該酵素を用いたシロイノシトールの製法に関する。

[0086] <シロイノシトールデヒドロゲナーゼ>

本発明のシロイノシトールデヒドロゲナーゼは、以下の反応式に示すように、シロ-

イノシトールとシロ-イノソース間の酸化還元反応を触媒し、NADHまたはNADPH存在下で、シロ-イノソースを立体特異的にシロ-イノシトールへ還元する。

[化6]

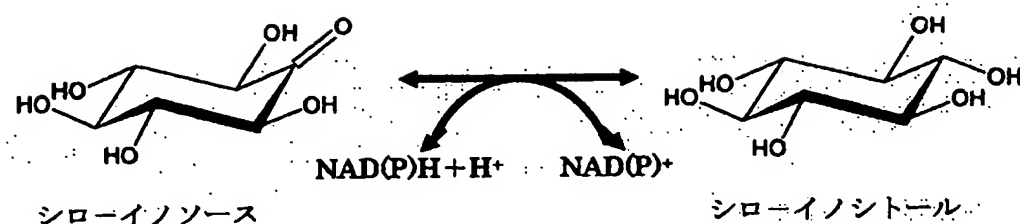


シロ-イノシトールデヒドロゲナーゼは上記反応活性を有するものである限り、その由来は限定されるものではないが、微生物由来であることが好ましく、大腸菌 (*Escherichia coli*)、アセトバクター属 (*Acetobacter*)、バチルス属 (*Bacillus*)、アグロバクテリウム属 (*Agrobacterium*)、キサントモナス属 (*Xanthomonas*) 等であることが特に好ましい。更に、大腸菌K-12株 ATCC10798 (*Escherichia coli* K-12 ATCC10798)、アセトバクター・エスピー AB10281株 FERM BP-10119 (*Acetobacter* sp. AB10281 FERM BP-10119)、バチルス ズブチリス 168株 ATCC23857 (*Bacillus subtilis* 168 ATCC23857)、アグロバクテリウム チュメファシエンス C58株 ATCC33970 (*Agrobacterium tumefaciens* C58 ATCC33970)、アグロバクテリウム・エスピー AB10121株 FERM P-17383 (*Agrobacterium* sp. AB10121 FERM P-17383)、キサントモナス キャンペストリス pv. キャンペストリス ATCC33913 (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris* ATCC33913) であることが特に好ましい。

[0087] 本発明のシロ-イノシトールデヒドロゲナーゼは、下記の理化学的性質を有するシロ-イノシトールデヒドロゲナーゼが含まれる。

反応: 以下の反応式に示すように、シロ-イノシトールとシロ-イノソース間の酸化還元反応を触媒し、NADHまたはNADPH存在下で、シロ-イノソースを立体特異的にシロ-イノシトールへ還元する。

[化7]



シロ-イノシトールデヒドロゲナーゼ活性の測定方法は、還元活性を測定する方法と、酸化活性を測定する方法、いずれの測定方法でも、測定可能であるが、酸化活性の測定は共存するミオ-イノシトール2-デヒドロゲナーゼに由来する活性により、精度が低く、また、酸化活性自体が微弱なため、好ましくは、還元活性を測定する方が望ましい。

還元活性の測定は、シロ-イノソースを基質にして、NADHまたは、NADPHを共存させ、NADHまたはNADPHの340nmの吸収の減少を測定することで成される。また、反応後の溶液を、HPLC、GLCなどの分析装置で、生産物(シロ-イノシトールか、ミオ-イノシトール)の判断でも可能である。

[0088] 本発明のシロ-イノシトールデヒドロゲナーゼは、好ましくはさらに下記の理化学的性質を有する。

分子量および会合特性: 38〜46kダルトン、2または3量体を形成する。

分子量は、SDS-PAGE(ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミド電気泳動)などの結果から、またはDNAの全長から酵素の推定分子量を算出することができる。また、会合特性は、ゲルろ過カラム(東ソー社:2000SW<sub>XL</sub>)で分画した画分の活性を測定し、相当する分子量画分から、分子量を計算し、これを、酵素の分子量で割った値を整数化することにより求めることが可能である。

[0089] また、本発明のシロ-イノシトールデヒドロゲナーゼは、好ましくはさらに下記の理化学的性質を有する。

補酵素:  $\text{NAD}^+$ 若しくは $\text{NADP}^+$ 又は $\text{NADH}$ 若しくは $\text{NADPH}$ を補酵素とする。

補酵素の選択性は、反応液(200mMトリス緩衝液pH8.0、2% NADPHまたはNADH、1%シロ-イノソース)5  $\mu$ lと、酵素液5  $\mu$ lを混合し、36℃、30min反応後、ただちに、500  $\mu$ lの水を加えて、340nmの吸光度を測定し、酵素液の代わりに水を用いた試験液のブランク値から、340nmの吸光度の減少量を測定することで確認することができる。な

お、%で示した値は質量／体積(W/V)の百分率を示すものであり、濃度を%で表示する場合は、以下においても同様とする。

[0090] また、上記測定法により補酵素相対活性も確認することが可能である。当該補酵素相対活性により、例えば、NADPH:NADHが100:1～100:10のグループ、100:10～100:30のグループ、100:30～100:60のグループ、100:60～100:120のグループに分けることも可能である。

[0091] また、本発明のシローイノシトールデヒドロゲナーゼは、好ましくはさらに下記の理化学的性質を有する。

活性化重金属 :  $\text{Co}^{2+}$  イオンの存在下で活性化される。または、 $\text{Mn}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$ 、 $\text{Ca}^{2+}$  イオンの存在下で活性化される場合もあり得る。

阻害重金属 :  $\text{Sn}^{2+}$  イオンの存在下で阻害される。または、 $\text{Zn}^{2+}$  イオンの存在下で阻害される場合もあり得る。

当該重金属による効果は、反応液(200mMトリス緩衝液pH8.0、2% NADPH、1%シローイノソース、2mM金属塩)5  $\mu$  lと、酵素液5  $\mu$  lを混合し、36℃、30min反応後、ただちに、500  $\mu$  lの水を加えて、340nmの吸光度を測定し、酵素液の代わりに水を用いた試験液のブランク値から、340nmの吸光度の減少量を測定することで確認できる。「活性化されるとは」重金属無添加区の酵素活性を100%としたときに重金属1mM添加区の酵素活性が105%以上を、好ましくは120%以上を示すことを意味する。一方、「阻害されるとは」重金属無添加区の酵素活性を100%としたときに重金属1mM添加区の酵素活性が95%以下に、好ましくは70%以下になることを意味する。

[0092] また、本発明のシローイノシトールデヒドロゲナーゼは、好ましくはさらに下記の理化学的性質を有する。

至適pH : 本発明酵素は、pH5～9で活性を有する。

至適pHは、反応液(200mMリン酸緩衝液pH5.0～9.0、2% NADPH、1%シローイノソース)5  $\mu$  lと、酵素液5  $\mu$  lを混合し、36℃、30min反応後、ただちに、500  $\mu$  lの水を加えて、340nmの吸光度を測定し、酵素液の代わりに水を用いた試験液のブランク値から、340nmの吸光度の減少量を測定することで確認できる。至適pHとは、最大活性の90%以上の活性を有することを意味する。本発明酵素は、例えば、至適pHの範囲に

より酸性側に至適pHがあるグループ(至適pHがpH5.5〜6.5)、中性域に至適pHがあるグループ(至適pHがpH6.5〜7.5またはpH6.5〜8.5)、アルカリ性側に至適pHがあるグループ(至適pHがpH7.0〜8.5またはpH7.5〜9.0)に分けることも可能である。

[0093] また、本発明のシロイノシトールデヒドロゲナーゼは、好ましくはさらに下記の理化学的性質を有する。

熱安定性:本発明のシロイノシトールデヒドロゲナーゼは、60℃まで安定である。

熱安定性は、酵素液を所定の温度で10min間処理した後、冷却し、この酵素液と反応液(200mMリン酸緩衝液pH5.0〜9.0、2% NADPH、1%シロイノソース)5 $\mu$ lを混合し、36℃、30min反応後、ただちに、500 $\mu$ lの水を加えて、340nmの吸光度を測定し、酵素液の代わりに水を用いた試験液のブランク値から、340nmの吸光度の減少量を測定することで確認できる。「熱安定であるとは」20℃10min処理区の活性を100%として、上記熱処理した酵素の活性が90%以上残存していることを意味する。

[0094] また、本発明のシロイノシトールデヒドロゲナーゼは、好ましくはさらに下記の理化学的性質を有する。

シロイノソースに対するKm値: シロイノソースに対するKm値は、2〜13mMを示す。

シロイノソースに対するKm値は、反応液(200mMトリス緩衝液pH8.0、2% NADPH、0.001〜2.5%シロイノソース)5 $\mu$ lと、酵素液5 $\mu$ lを混合し、36℃、30min反応後、ただちに、500 $\mu$ lの水を加えて、340nmの吸光度を測定し、酵素液の代わりに水を用いた試験液のブランク値から、340nmの吸光度の減少量を測定することで確認できる。測定値は定法に従い、逆数プロットし、Km値を算出する。本発明酵素は、例えば、シロイノソースに対するKm値が4mM未満のグループ、4mM以上10mM未満のグループ、10mM以上13mM未満のグループに分けることも可能である。

[0095] また、本発明のシロイノシトールデヒドロゲナーゼは、好ましくはさらに下記の理化学的性質を有する。

基質特異性:相対活性が70%以上の基質は、シロイノシトール(SI)、ミオイノシトール(MI)、D-キロイノシトール(DCI)、エピーイノシトール(EI)、L-キロイノシトール(LCI)が挙げられる。相対活性が20%以上70%未満の基質は、L-キロイノ

シトール(LCI)、エピーイノシトール(EI)、ムコーイノシトール(MuI)、ミオーイノシトール(MI)、D-キローイノシトール(DCI)、アローイノシトール(AI)、ネオーイノシトール(NI)が挙げられる。相対活性が20%未満の基質は、アローイノシトール(AI)、ネオーイノシトール(NI)、D-キローイノシトール(DCI)、L-キローイノシトール(LCI)、エピーイノシトール(EI)、ムコーイノシトール(MuI)が挙げられる。

基質特異性は、酸化活性を指標にシローイノシトールに対する反応性に対する相対活性を測定することで確認できる。イノシトール異性体としては、シローイノシトール(SI)、ミオーイノシトール(MI)、D-キローイノシトール(DCI)、L-キローイノシトール(LCI)、エピーイノシトール(EI)、ムコーイノシトール(MuI)、アローイノシトール(AI)、ネオーイノシトール(NI)等が挙げられる。本発明のシローイノシトールデヒドロゲナーゼの基質特異性は、相対活性が70%以上の区、70%未満20%以上の区、20%未満の区に分けて示すことが可能である。

測定方法として、反応液(各種イノシトール異性体1%(ネオーイノシトールのみ0.4%)、200mMトリス緩衝液pH8.0、0.002%NADP<sup>+</sup>、0.002%ジアホラーゼ、0.01%ニトロテトラゾリウムブルー)50 $\mu$ lと、酵素液50 $\mu$ lを混合し、25℃、3min毎に、545nmの吸光度の増加をマイクロプレートリーダーで測定することが可能である。

[0096] これら理化学的性質は、そのいずれかの組み合わせを有していることが望ましい。

[0097] <シローイノシトールデヒドロゲナーゼの製造および精製>

シローイノシトールデヒドロゲナーゼの製造に使用することのできる微生物としては、該酵素の生産能を有する限り特に限定されないが、例えば、大腸菌K-12株 ATCC10798(*Escherichia coli* K-12 ATCC10798)(以下、大腸菌K-12株ともいう)、アセトバクター・エスピー AB10281株 FERM BP-10119(*Acetobacter* sp. AB10281 FERM BP-10119)(以下、AB10281株ともいう)、バチルス ズブチリス 168株 ATCC23857(*Bacillus subtilis* 168 ATCC23857)(以下、*Bacillus* sub.168株、*B. sub.*168株ともいう)、アグロバクテリウム チュメファシエンシス C58株 ATCC33970(*Agrobacterium tumefaciens* C58 ATCC33970)(以下、*A. tume.*C58株ともいう)、アグロバクテリウム・エスピー AB10121株 FERM P-17383(*Agrobacterium* sp. AB10121 FERM P-17383)(以下、AB10121株ともいう)、キサントモナス キャンペストリス pv.



キャンペストリス ATCC33913 (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris* ATCC33913) (以下、X.camp.ともいう)が挙げられる。

シロイノシトールデヒドロゲナーゼを製造する目的で、これら微生物を培養するために用いる培地は、従来知られる一般的な微生物用培地を使用することが可能である。例えば、アセトバクター・エスピー AB10281株 FERM BP-10119、バチルス ズブチリス 168株 ATCC23857、アグロバクテリウム チュメファシエンス C58株 ATCC33970、アグロバクテリウム・エスピー AB10121株 FERM P-17383、キサントモナス キャンペストリス pv. キャンペストリス ATCC33913を培養するときの培地組成は、目的に達する限り何ら特別の制限はなく、シロイノシトールへの変換原料であるミオイノシトールに加えて、炭素源、窒素源、有機栄養源、無機塩類等を含有する培地であればよく、合成培地・天然培地のいずれも使用できる。ミオイノシトールを0.1〜40%、より好ましくは10〜30%添加し、炭素源としては、グリセロール、シュークロース、マルトースあるいは澱粉を0.1〜20%、より好ましくは0.3〜5%、窒素源としては、酵母エキス、ペプトン、カザミノ酸、硫酸アンモニウム、塩化アンモニウム、硝酸アンモニウムあるいは尿素等を0.01〜5.0%、好ましくは0.5〜2.0%添加するのが望ましい。その他、必要に応じ、ナトリウム、カリウム、カルシウム、マグネシウム、コバルト、マンガ、亜鉛、鉄、銅、モリブデン、リン酸、硫酸などのイオンを生成することができる無機塩類を培地中に添加することができる。培養液中の水素イオン濃度は特に調製する必要は無いが、好ましくはpH4〜10、より好ましくはpH5〜9に調整し培養すると、効率よくシロイノシトールデヒドロゲナーゼ含有する菌体を得ることができる。

[0098] 培養条件は、培地の種類によっても異なるが、培養温度は12〜38℃、好ましくは20〜27℃であり、また、培養は液体培地を振とうするか、液体培地中に空気あるいは酸素ガスを吹き込むなどして好氣的に行えば良い。培養期間は、シロイノシトールデヒドロゲナーゼが最大または、必要量の活性量を示すまで行えば良く、通常1〜10日、好ましくは3〜8日である。

[0099] 一方、大腸菌K-12株 ATCC10798を培養する時の培地の組成も、目的に達する限り何ら特別の制限はなく、炭素源、窒素源、有機栄養源、無機塩類等を含有する培地であればよく、合成培地・天然培地のいずれも使用できる。例えば、LB培地や、

TB培地の他、YT培地などが例示される。さらに、大腸菌K-12株 ATCC10798のシロイノシトールデヒドロゲナーゼの比活性を約3倍増加させる物質として、培地にソルボースを0.05〜1%、好ましくは0.5%添加するのが望ましい。培養条件は、培地の種類によっても異なるが、培養温度は28〜38℃、好ましくは36℃であり、また、培養は液体培地を振とうするか、液体培地中に空気あるいは酸素ガスを吹き込むなどして好氣的に行えば良い。培養期間は、シロイノシトールデヒドロゲナーゼが最大または、必要量の活性量を示すまで行えば良く、通常1〜3日、好ましくは1日である。

- [0100] この様に培養した菌体から酵素を分離精製することによりシロイノシトールデヒドロゲナーゼを得ることができる。酵素の分離精製は、通常のタンパク質精製方法と同様にして行うことができる。以下具体的に説明するが、分離精製方法はこれらに限定されない。
- [0101] まず、培養後に得られた菌体を集めるためには、遠心分離や、膜濃縮などの方法が使用できる。必要であれば、この段階で、菌体を適当な溶液に懸濁し、再度、遠心分離や、膜濃縮などの方法で、菌体を集めることで洗浄することができる。このようにして得られた菌体は、次に、オートミールや、超音波などの物理的方法で破碎し、菌体内に存在する本発明酵素を抽出することが可能である。
- [0102] 破碎された菌体を含む菌体破碎液は、遠心分離や、膜濃縮などの方法で、可溶物と、不溶物に分けられる。その後、可溶物から当該酵素を単離するために、一般的な酵素精製の手順に則って、精製することができる。すなわち、ブルートヨパール(東ソー社)などのアフィニティーカラム、DEAEカラム、CMカラムに代表されるイオン交換カラム、ゲルろ過カラム、ヒドロキシアパタイトカラム、などのカラム操作の他、硫酸分画法、等電点沈殿法などのバッチワイズな操作法も使用できる。
- [0103] シロイノシトールデヒドロゲナーゼ活性の測定方法は、還元活性を測定する方法と、酸化活性を測定する方法、いずれの測定方法でも、測定可能であるが、酸化活性の測定は共存するミオイノシトール2-デヒドロゲナーゼに由来する活性により、精度が低く、また、酸化活性自体が微弱なため、好ましくは、還元活性を測定する方が望ましい。還元活性の測定は、シロイノソースを基質にして、NADHまたは、NADPHを共存させ、NADHまたはNADPHの340nmの吸収の減少を測定することで成される。ま

た、反応後の溶液を、HPLC、GLCなどの分析装置で、生産物(シロ-イノシトールか、ミオ-イノシトール)の判断も可能である。

[0104] 精製された酵素は、その精製度をNative(ネイティブ)PAGEや、SDS(ドデシル硫酸ナトリウム)PAGEなどを用いた電気泳動によって、確認することができる他、PVD F膜などのタンパク吸着性膜へ、トランスブロットすることにより、相当するタンパク質をより高度に精製することができる。

[0105] 本発明のシロ-イノシトールデヒドロゲナーゼとして具体的には、以下の(a)または(b)のタンパク質が挙げられる。

(a) 配列番号2、4、6、8、10、12、14または28に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質。

(b) 配列番号2、4、6、8、10、12、14または28に記載のアミノ酸配列において、1もしくは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および/または付加したアミノ酸配列を有し、シロ-イノシトールとシロ-イノソース間の酸化還元反応を触媒し、NADHまたはNADPH存在下で、シロ-イノソースを立体特異的にシロ-イノシトールへ還元する酵素活性を有するタンパク質。

この中で配列番号28のアミノ酸配列を有するシロ-イノシトールデヒドロゲナーゼは、本発明によって提供される新規なタンパク質である。

[0106] 上記「1もしくは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および/または付加したアミノ酸配列を有し、シロ-イノシトールとシロ-イノソース間の酸化還元反応を触媒し、NADHまたはNADPH存在下で、シロ-イノソースを立体特異的にシロ-イノシトールへ還元する酵素活性を有するタンパク質」とは、シロ-イノシトールとシロ-イノソース間の酸化還元反応を触媒し、NADHまたはNADPH存在下で、シロ-イノソースを立体特異的にシロ-イノシトールへ還元する酵素活性を実質的に害さない1もしくは複数のアミノ酸残基の置換、欠失、挿入、および/または付加を有していてもよいことを示す。

[0107] すなわち、天然に存在するタンパク質には、それをコードするDNAの多形や変異の他、生成後のタンパク質の細胞内および精製中の修飾反応などによってそのアミノ酸配列中にアミノ酸の置換、欠失、挿入、および/または付加等の変異が起こりうる

が、それにもかかわらず変異を有しないタンパク質と実質的に同等の生理、生物学的活性を示すものがあることが知られている。このように構造的に若干の差違があってもその機能については大きな違いが認められないものも、本発明タンパク質に包含される。人為的にタンパク質のアミノ酸配列に上記のような変異を導入した場合も同様であり、この場合にはさらに多種多様の変異体を作製することが可能である。また、ある種のタンパク質は、活性には必須でないペプチド領域を有していることが知られている。例えば、細胞外に分泌されるタンパク質に存在するシグナルペプチドや、プロテアーゼの前駆体等に見られるプロ配列などがこれにあたり、これらの領域のほとんどは翻訳後、または活性型タンパク質への転換に際して除去される。このようなタンパク質は、一次構造上は異なった形で存在しているが、最終的には同等の機能を有するタンパク質であり、本発明のシロイノシールデヒドロゲナーゼに包含されるものである。

[0108] なお本明細書における「複数のアミノ酸」とは、本発明酵素の活性が失われない程度の変異を起こしてもよいアミノ酸の数を示し、例えば400アミノ酸残基からなるポリペプチドの場合、2〜20程度、好ましくは2〜10、より好ましくは2〜3の数を示す。また、本発明タンパク質との相同性が、80%以上、より好ましくは90%以上、さらに好ましくは95%以上、特に好ましくは98%以上となる程度の数値を示すタンパク質は本発明のシロイノシールデヒドロゲナーゼに含まれる。

[0109] 本発明のシロイノシールデヒドロゲナーゼとしてはまた、以下のDNAによってコードされるものがあげられる。

(a) 配列番号1、3、5、7、9、11、13または27に記載の塩基配列のコード領域を含むDNA。

(b) 配列番号1、3、5、7、9、11、13または27に記載の塩基配列もしくは同塩基配列に相補的な塩基配列を有するDNAとストリジェントな条件下でハイブリダイズし、シロイノシールとシロイノソース間の酸化還元反応を触媒し、NADHまたはNADPH存在下で、シロイノソースを立体特異的にシロイノシールへ還元する酵素活性を有するタンパク質をコードするDNA。

この中で配列番号27の塩基配列を有するDNAは、本発明によって提供される新規

な、シロイノシトールデヒドロゲナーゼをコードするDNAである。

- [0110] ここでいう「ストリンジェントな条件下」とは、いわゆる特異的なハイブリッドが形成され、非特異的なハイブリッドが形成されない条件をいう(Sambrook, J. et al., Molecular Cloning A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)等参照)。「ストリンジェントな条件下」として具体的には、50%ホルムアミド、4×SSC、50mMHEPES (pH7.0)、10×Denhardt's solution、100 μg/mlサケ精子DNAを含む溶液中、42℃でハイブリダイズさせ、次いで室温で2×SSC、0.1%SDS溶液、50℃下で0.1×SSC、0.1%SDS溶液で洗浄する条件が挙げられる。、別の言い方をすれば、好ましくは80%以上、より好ましくは90%以上、さらに好ましくは95%以上、特に好ましくは98%以上の相同性を有するDNAが特異的にハイブリダイズする条件が挙げられる。すなわち、配列番号1、3、5、7、9、11、13または27に記載の塩基配列との相同性が、80%以上、より好ましくは90%以上、さらに好ましくは95%以上、特に好ましくは98%以上であるDNAは本発明のシロイノシトールデヒドロゲナーゼをコードするDNAに含まれる。

- [0111] <シロイノシトールデヒドロゲナーゼを用いたシロイノシトールの製造方法>

本発明はさらに、シロイノシトールデヒドロゲナーゼと、ミオイノシトール2-デヒドロゲナーゼとを共存させた溶液中で、NADHまたはNADPH存在下で、(図1を参照)、安価なミオイノシトールを基質として、シロイノソースを経由して、シロイノシトールへ酵素変換反応させることを特徴とする、シロイノシトールの製造方法に関する。

- [0112] 当該製造方法で使用するシロイノシトールデヒドロゲナーゼは、上述した酵素の精製によって製造した酵素であってもよく、シロイノシトールデヒドロゲナーゼをコードするDNAを用いた遺伝子操作によって製造したリコンビナント酵素でもよい。

- [0113] シロイノシトールデヒドロゲナーゼをコードするDNAは、例えば、微生物から抽出した全ゲノムを鋳型にして、配列番号1、3、5、7、9、11、13または27などの塩基配列を有するDNAをポリメラーゼチェーンリアクション(PCR)によって増幅することにより単離できる。

また、シロイノシトールデヒドロゲナーゼをコードするDNAは、その相同性から検索されるホモログDNAを単離することによっても得ることが可能である。ここで、ydgJ

遺伝子と称される一連の相同性の高い遺伝子は、シロイノシトールデヒドロゲナーゼをコードするDNAである可能性が高い。

- [0114] このようにして得たDNAをプラスミドベクターに組み込む。この際に使用するプラスミドは、好ましくは、マルチクローニングサイトを有する発現プラスミドベクターが使用されるが、酵素を発現させることが可能であり、かつ、適当な制限酵素サイトを有する他のプラスミドベクターであっても使用できる。あらかじめ断片の末端に、適切な制限酵素サイトを設定しておき、これをプラスミドベクター上にある同じ制限酵素サイトへ、ライゲートさせることによって、プラスミドを構築できる。

また、プラスミドに組み込まれたDNAを発現させるために使用されるプロモーターは、宿主微生物中で、DNAが発現すれば、特に限定されない。例えばlacプロモーター、tacプロモーターなどが使用できる。

- [0115] このように調製された組換えプラスミドベクターは、宿主微生物に導入することが可能である。この際用いられる宿主微生物としては、組換えプラスミドベクターが、安定でかつ自律的に増殖可能であるものであれば特に制限されず、通常の遺伝子組換えに用いられているもの、例えばエッシャーヒア属、バチルス属に属する微生物などが好ましく使用され、更に好ましくは大腸菌 (*Escherichia coli*) が使用できる。

- [0116] 宿主微生物に組換えプラスミドベクターを導入する方法としては、例えば宿主微生物がエッシャーヒア属に属する微生物の場合には、カルシウムイオンの存在下で、組換えDNAの導入を行ってもよいし、コンピテントセル法を用いてもよい、またバチルス属に属する微生物の場合には、コンピテントセル、プロトプラスト法、エレクトロポレーション法またはマイクロインジェクション法を用いることが可能である。宿主微生物への所望組換えDNA導入の有無の選択については、組換えプラスミドベクターを構成するベクターの薬剤耐性マーカーに基づく選択培地で、当該宿主微生物を培養し、生育する宿主微生物を選択すればよい。

- [0117] 次に、酵素を発現誘導するために使用される培地は、宿主微生物が安定して増殖する培地であれば、特に限定されない。例えば、Nutrient Broth、L-Broth、などを例示することができる。また、プラスミドベクターの種類によっては、培地中にDNAを発現させるためにイソプロピルチオガラクトピラノシド (IPTG) のようなインデューサーを

加えてもよいし、培養途中にインデューサーを加えても良い。

- [0118] このように調製されたDNAをもつ組換えプラスミドベクターを導入した宿主微生物を培養し、本発明DNAを発現させる。発現した本発明酵素を有する微生物は、遠心分離され、培地を除去し、さらに、ペレットとなった微生物を水で洗浄後、遠心分離し、洗浄菌体を得ることができる。この洗浄菌体を水、または適当な溶液に懸濁させ、超音波によって菌を破碎する。破碎後、遠心分離し、上清の本発明DNA由来のリコンビナント酵素を含有する溶液を得る事ができる。
- [0119] リコンビナント酵素を発現した菌体は、洗浄後に、そのまま反応溶液に加えて、菌体懸濁液として反応させることもできるが、好ましくは、菌体を破碎し、菌体内に存在する酵素を抽出した溶液を用いることが好ましい。また、この抽出液を精製して使用することもできる。精製としては硫安分画処理、または、イオン交換樹脂に吸着後、塩濃度による直線濃度勾配を利用したカラムクロマトグラフィー、温度処理などによって、精製することができる。さらに、本酵素は固定化酵素もしくは固定化菌体としても使用可能である。固定化法としては、ゲル抱埋法、イオン交換樹脂吸着法など、一般の固定化方法が適用できる。
- [0120] 一方、当該方法で使用するミオーイノシトール2-デヒドロゲナーゼは、 $\text{NAD}^+$ または $\text{NADP}^+$ 存在下で、ミオーイノシトールを酸化し、シローイノソースを生成する酵素を用いることが好ましい。

この製造方法では既知の $\text{NAD}^+$ または $\text{NADP}^+$ 依存型ミオーイノシトール2-デヒドロゲナーゼを使用することができる。例えば、市販の酵素、バチルス ズブチリス、バチルス ハロデュランスなどの培養菌体から精製することによって製造した酵素、または、遺伝子配列が既知であることから、遺伝子操作によって発現させたリコンビナント酵素を使用してもよい。

既知のミオーイノシトール2-デヒドロゲナーゼのアミノ酸配列としては、例えば、NCBI(National Center for Biotechnology Information)のプロテインデータベースにアクセス番号2636516、17982589、23464076、10174936、17742455、50120397、28853468、または13422633で登録されており、これらのアミノ酸配列をコードする塩基配列情報も上記アクセス番号のCDSを参照することにより得ることができる。

リコンビナント酵素を発現した菌体は、洗浄後に、そのまま反応溶液に加えて、菌体懸濁液として反応させることもできるが、好ましくは、菌体を破碎し、菌体内に存在する酵素を抽出した溶液を用いることが好ましい。また、本抽出液を精製して使用することもできる。精製としては硫酸分画処理、または、イオン交換樹脂に吸着後、塩濃度による直線濃度勾配を利用したカラムクロマトグラフィー、温度処理などによって、精製することができる。さらに、本酵素は固定化酵素もしくは固定化菌体としても使用可能である。固定化法としては、ゲル抱埋法、イオン交換樹脂吸着法など、一般の固定化方法が適用できる。

- [0121] リコンビナント酵素を使用する場合、遺伝子操作により、ミオ-イノシトール2-デヒドロゲナーゼと、本発明酵素を両方同時に発現させることも可能であり、そのようにして発現し調製された酵素液等を使用することもできる。
- [0122] 本反応系でのミオ-イノシトール2-デヒドロゲナーゼと、シロ-イノシトールデヒドロゲナーゼの活性量(U)の比率は、ユニット数で定義すると、36℃において、基質をシロ-イノソースとした時、1min間に1  $\mu$  molのNADHまたはNADPHが消費されるのを1Uとした場合、両方の活性量(U)の比率が、1:10~10:1、好ましくは1:2~2:1になるようにするのが望ましい。
- [0123] 本反応系では、補酵素NAD<sup>+</sup>またはNADP<sup>+</sup>が必要であり、反応液中でNADHまたはNADPHに変換され、且つ、NADHまたはNADPHはNAD<sup>+</sup>またはNADP<sup>+</sup>に戻るため、リサイクルされることがわかる。NAD<sup>+</sup>またはNADP<sup>+</sup>とNADHまたはNADPHは、溶液中のpH安定性が異なり、NAD<sup>+</sup>またはNADP<sup>+</sup>はpH8.0以下で安定であり、NADHまたはNADPHはpH8.0以上で安定である。従って、本反応系のpHは約pH8.0に保つことが好ましい。
- [0124] 本酵素反応に使用する補酵素は、NAD<sup>+</sup>、NADH、NADP<sup>+</sup>、NADPHの何れか1つ又は、これらの混合物としても利用することができるが、安定性を考慮すると、NAD<sup>+</sup>または、NADP<sup>+</sup>が望ましく、その濃度は、0.0001~0.1%、好ましくは0.004~0.01%添加することが望ましい。
- [0125] 加えて、本反応系の中間体であるシロ-イノソースを反応溶液に添加することにより、本反応の反応速度は著しく増大する。従って、シロ-イノソースを0.01~3%、好まし



くは0.2〜0.5%になるように反応溶液に添加するのが望ましい。

[0126] また、ミオイノシトール2-デヒドロゲナーゼとシロイノシトールデヒドロゲナーゼは、pH8.0において反応させることができるため、酵素反応の溶液のpHは、pH6.0〜8.5の範囲に調整して反応させるが、 $\text{NAD}^+$ または $\text{NADP}^+$ の安定性、シロイノソースの安定性を考慮して、好ましくはpH7.7〜8.3、さらに好ましくは、pH8.0が望ましい。また、反応中に、このpHを反応中に保つために、必要があれば、緩衝液を加えることもできる。加える緩衝液の種類は特に限定されないが、pH8.0付近で緩衝能力のある緩衝液が望ましく、さらに好ましくは、リン酸緩衝液、トリス緩衝液などが例示される。

[0127] さらに、ミオイノシトール2-デヒドロゲナーゼは、 $\text{Mg}^{2+}$ イオンで活性化され、シロイノシトールデヒドロゲナーゼは、 $\text{Co}^{2+}$ イオンで活性化されることから、これらの金属イオンを添加することで、反応速度は増大する。従って、Co塩および／または、Mg塩を0.01〜5.0mM、好ましくは0.2〜2.0mMになるように反応溶液に添加するのが望ましい。使用されるCo塩、Mg塩は水に溶解する塩であれば使用することができ、塩酸塩、硫酸塩などが例示される。

[0128] 本発明に使用する基質であるミオイノシトールの反応溶液中の濃度は1〜30%、好ましくは5〜22%で使用するのが望ましい。反応が進行すると、1.6%を超える過飽和のシロイノシトールは結晶として析出するため、ミオイノシトールは減少する。そのため、減少したミオイノシトール量を反応溶液に添加して、ミオイノシトール濃度を一定に維持し、反応を連続的行なうこともできる。

[0129] 反応温度は、反応が進行すれば、特に限定されないが、基質の溶解度、 $\text{NAD}^+$ または $\text{NADP}^+$ の安定性、酵素の耐熱性を考慮すると、20〜50℃、好ましくは35〜40℃で反応させることが望ましい。菌体を懸濁する方法であれば、不均一反応の為に、攪拌を必要とするが、抽出酵素を使用する場合は、均一溶液なので、攪拌する必要はないが、温度を均一化するため攪拌することが望ましい。

[0130] 酵素反応は反応物であるシロイノシトールが溶解度以上になれば、結晶性シロイノシトールとして沈殿させることができるため、ろ過、デカンテーション等の固液分離を用いれば、反応を停止させる必要は無く、ろ過液などの溶液に再度ミオイノシトールを添加して反応を続けることができる。

- [0131] 酵素反応の停止が必要な場合は、酵素反応自体が停止すればよく、加熱、pHの変化、タンパク質変性剤の添加などの方法が使用できる。しかしながら、次工程のシロイノシトールの精製を考慮すると、加熱が望ましい。例えば、反応溶液を70〜120℃、好ましくは80〜90℃で10〜20分間加熱するなどが例示できる。
- [0132] また、酵素反応の停止は、酵素を回収して、反応を停止させることもできる。酵素回収はイオン交換樹脂カラムに反応溶液を通過させることにより酵素を回収することができる。固定化された酵素を使用した場合は、反応溶液を遠心分離、あるいはろ過操作することによって、固定化酵素を回収することができる。
- [0133] 反応停止後、または反応中に過飽和になったシロイノシトールは結晶として析出する。結晶性シロイノシトールは、ろ別、または遠心分離などの操作で単離することができる。さらに、菌体、不溶性変成タンパクと共存する場合は、水を加えて結晶性シロイノシトールを溶解後に、ろ別、または遠心分離などの操作を加えることで、菌体、不溶性変成タンパクを除去することができる。
- [0134] このようにして得られた結晶性シロイノシトールの精製方法は以下の様に行なうことができる。この段階で留意する点は、結晶性シロイノシトール中に含まれる、ネオイノシトールの除去である。ネオイノシトールは、シロイノシトールデヒドロゲナーゼが、一部のミオイノシトールの5位を酸化することによって生じるネオイノソースが、ミオイノシトール2-デヒドロゲナーゼによって、還元されて生じた物質で、本反応系で微量に生じる物質である。また、ネオイノシトールは、水溶解度が0.5%と、低く、シロイノシトールと共に結晶性の沈殿を起こしやすい物質である。
- [0135] しかし、この結晶性シロイノシトールを再度水に溶解して得られるシロイノシトール溶液は、ミオイノシトールを殆ど含んでおらず、再濃縮した時に生じる結晶性シロイノシトールをろ別、または遠心分離などの操作で単離する操作で、微量のネオイノシトールを含有するシロイノシトールを得る事ができる。また、より高度に精製する場合、脱塩カラム、活性炭カラムを通過させて、精製後、液体を濃縮することで、再び結晶化してくる再結晶シロイノシトールをろ別、または遠心分離などの操作で単離することで、ネオイノシトールを含まない純品シロイノシトールを得る事ができる。
- [0136] 脱塩カラムは、イオン交換樹脂を用いたカラムが望ましい。この際に使用されるイオ

ン交換樹脂は、強塩基性イオン交換樹脂、および、弱塩基性イオン交換樹脂の何れか1つ、もしくは、両方の混合物と、強酸性イオン交換樹脂、及び弱酸性イオン交換樹脂の何れか1つ、もしくは、両方の混合物が使用できる。イオン交換樹脂の作用のさせ方は、カラム状に詰めたイオン交換樹脂中に溶液を通す方法が最適であるが、バッチ式で攪拌混合し、ろ過することで脱塩することも可能である。

[0137] 活性炭カラムは、脱色を目的とし、溶液をカラム状に詰めた活性炭中に溶液を通す方法も使用できるが、バッチ式で攪拌混合し、ろ過することで脱色することも可能である。

[0138] 次に、酵素反応停止後、反応溶液中に溶解している溶解性シロイノシトールの精製方法は以下の様にして行なうことができる。この段階で留意する点は、結晶性シロイノシトールと異なり、ミオイノシトール、とネオイノシトールの除去である。

[0139] 溶解性シロイノシトールは、原料のミオイノシトール、およびネオイノシトールと一緒に溶解しており、ろ別、または遠心分離などの操作で溶液として、取り出すことができる。これらの溶液は、他に、溶解性ペプチド、塩を含んでいるため、脱塩カラム、活性炭カラムを通過させて、精製後、ミオイノシトールが析出しない程度(ミオイノシトールが21%以上にならないよう)に濃縮し、析出してくる結晶性シロイノシトールをろ別、または遠心分離などの操作で単離することができる。必要があれば、水と混和する有機溶媒を加えて、結晶化させることも可能である。有機溶媒としては、メタノール、エタノール、プロパノールなどが挙げられる。

[0140] また、後述するように、得られたシロイノシトールを含む溶液に、ホウ酸と、NaClを加えて、シロイノシトールホウ酸複合体を作り、これをろ別後に、酸によりホウ酸を遊離させ、メタノールのような有機溶媒を加えることで結晶化させる方法によって、シロイノシトールを分離精製してもよい。

[0141] 4. シロイノシトール及びシロイノシトール以外の中性糖を含有する混合液からシロイノシトールを製造する方法

本発明はさらに、シロイノシトール及びシロイノシトール以外の中性糖を含有する混合液からシロイノシトールを製造する方法に関する。

<4-1>

当該方法の一形態は、シロ-イノシトール及びシロ-イノシトール以外の中性糖を含有する混合液に、該混合液中に溶解したシロ-イノシトールの2倍モル以上の量のホウ酸及び金属塩を加え、かつ該混合液のpHを8.0〜11.0に調整してシロ-イノシトール・ホウ酸複合体を形成させる第1の工程、前記複合体を混合液から分離する第2の工程、分離した複合体を酸に溶解させてシロ-イノシトールとホウ酸に開裂させる第3の工程、第3の工程で得られた酸性溶液又は酸性懸濁液からシロ-イノシトールを単離精製する第4の工程を含む、精製されたシロ-イノシトールの製造方法である。

[0142] この製造方法の第1の工程は、シロ-イノシトール及びシロ-イノシトール以外の中性糖を含有する混合液に、該混合液中に溶解したシロ-イノシトールの2倍モル以上の量のホウ酸及び金属塩を加え、かつ該混合液のpHを8.0〜11.0に調整してシロ-イノシトール・ホウ酸複合体を形成させる工程である。

[0143] ここで用いる「シロ-イノシトール及びシロ-イノシトール以外の中性糖を含有する混合液」は溶液であっても懸濁液であってもよい。さらに、「シロ-イノシトール及びシロ-イノシトール以外の中性糖」以外の物質を含むものであってもよく、予め少量のシロ-イノシトール・ホウ酸複合体を含むものであってもよい。混合液中に含まれる中性糖としては、4炭糖、5炭糖、6炭糖、7炭糖の中性糖が好ましく、例えば、グルコース、フルクトース、ガラクトースなどのアルドース、ケトース、イノシトールの各種異性体、及びグリセロール、エチレングリコールなどの多価アルコール類を挙げることができる。ここで、イノシトールの異性体としては、例えばミオ-イノシトール、D-キロ-イノシトール、L-キロ-イノシトール、エピー-イノシトール、ムコ-イノシトール、アロ-イノシトール、シス-イノシトール、ネオ-イノシトールを挙げることができる。

[0144] これらのうち、ミオ-イノシトールを特に好適に使用することができ、この場合の「シロ-イノシトール及びシロ-イノシトール以外の中性糖を含有する混合液」としては、例えば、以下に示すようにしてシロ-イノソースを還元した場合に生じる、シロ-イノシトールとミオ-イノシトールを含む混合液を挙げることができる。

[0145] 還元反応に用いるシロ-イノソースは、例えば、培地や溶液中で微生物を用いてミオ-イノシトールを酸化することによって得られるもの(特開2003-102492号公報)を使用することができる。微生物酸化によって得られるシロ-イノソースは、精製した後に

溶解して用いてもよいが、培養ろ液を用いてもよい。また、白金触媒でミオーイノシトールを酸化して調製したシローイノソースを使用することもできる。

- [0146] シローイノソースをシローイノシトールに還元するために用いる還元剤は、水系中でシローイノソースをシローイノシトールに還元することのできる還元剤であれば特に限定されないが、例えば、水素化ホウ素ナトリウム、水素化ホウ素リチウム、水素化ホウ素カリウム、水素化トリメトキシホウ素ナトリウム、シアン化水素化ホウ素ナトリウムを例示することができる。
- [0147] シローイノソースの還元反応は、例えば、20% (w/v) 以下の含量でシローイノソースを溶解した溶液に、還元剤を粉末または水溶液として添加することによって行うことができる。この際に溶液を攪拌することが好ましい。また、還元反応により反応熱が発生することがあるが、生成したイノソースの分解を押さえるために、反応液を50℃以下になるように制御するのが望ましい。さらに、水素化ホウ素ナトリウム等の還元剤を使用する場合には、還元剤の一部が分解して水素ガスが発生することがあるが、水素ガスの発泡を押さえるために消泡剤などを添加しておくことが好ましい。
- [0148] シローイノソースの還元によって得られるシローイノシトールとミオーイノシトールの混合液中において、シローイノシトールは、濃度が約1.6% (w/v) を超えると、徐々に結晶化を始める。通常、5% (w/v) のシローイノソース水溶液の還元により、約3% (w/v) ミオーイノシトール、及び約2% (w/v) シローイノシトールが生じるが、室温で数時間放置すると、シローイノシトールの過飽和部分の約0.4% (w/v) が結晶化を始める。そのため、シローイノソースの還元によって得られるシローイノシトールとミオーイノシトールの混合液を用いる場合は、このシローイノシトール自体の結晶が出る前に、シローイノシトール・ホウ酸複合体を形成させる工程を行う方が好ましい。シローイノソースの還元反応後、直ぐにシローイノシトール・ホウ酸複合体を形成させる工程を行うことがより好ましい。
- [0149] 第1の工程では、上記のような「シローイノシトールとミオーイノシトールを含む混合液」などの「シローイノシトール及びシローイノシトール以外の中性糖を含有する混合液」に、ホウ酸及び金属塩を、それぞれ、混合液中に溶解しているシローイノシトールの2倍モル以上、好ましくは2倍モル以上、かつ3倍モル以下の量で加えて、溶解させた

後、混合液のpHをpH8.0～11.0、好ましくはpH9.0～10.0のアルカリ性に調整することによって行う。なお、ここで2倍モルとは2倍のモル数をいう。反応液のpHはNaOH、KOH、 $\text{Na}_2\text{CO}_3$ 、 $\text{K}_2\text{CO}_3$ などの塩基で調整することができる。

[0150] ここで、添加する金属塩は、例えば $\text{NaCl}$ 、 $\text{NaHCO}_3$ 、 $\text{Na}_2\text{CO}_3$ 、 $\text{Na}_2\text{SO}_4$ 、 $\text{NaHSO}_4$ 、 $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 、 $\text{Na}_3\text{PO}_4$ 、硼砂、 $\text{KCl}$ 、 $\text{KHCO}_3$ 、 $\text{K}_2\text{CO}_3$ 、 $\text{K}_2\text{SO}_4$ 、 $\text{KHSO}_4$ 、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、 $\text{K}_2\text{HPO}_4$ 、 $\text{K}_3\text{PO}_4$ 、 $\text{MgCl}_2$ 、 $\text{MgCO}_3$ 、および $\text{MgSO}_4$ からなる群より選ばれる、1種または2種類以上の金属塩を使用することができる。また、添加するホウ酸の量は、混合液中に既にホウ酸が含まれている場合は、その量と合わせて、溶解シロイノシールの量の2倍以上のモル数、好ましくは2倍以上、かつ3倍以下のモル数になるような量にする。

[0151] 第1の工程は、ホウ酸や金属塩を混合液中に効率よく溶解させるため、及びpH調整時に溶液を均一にするために、攪拌しながら行うことが好ましい。この工程は、5℃～85℃、好ましくは15～40℃の範囲の温度で行なうのが望ましい。この工程に要する時間は、シロイノシール・ホウ酸複合体が必要量得られる限り特に限定されないが、90%以上の回収率を得るためには、12～76時間が好ましい。

[0152] シロイノシール・ホウ酸複合体は、NMRで確認した水への溶解度が0.01% (w/v) 以下であるため、混合液中では大部分が沈殿として存在する。第2の工程では、このシロイノシール・ホウ酸複合体を混合液から分離する。この工程では、通常の固液分離操作が適用でき、例えば、ろ過操作、遠心分離操作などが適用しうる。なお、この工程によってシロイノシール・ホウ酸複合体を分離した後の混合液中に残留するシロイノシールは、0.2% (w/v) 以下の濃度であるため、反応開始前の混合液中に含有されていたシロイノシールの大部分をシロイノシール・ホウ酸複合体の形で回収できることになる。一方、ミオイノシール等の中性糖は溶液中に溶解した状態で存在するため、ろ過操作ではろ液に存在し、この工程によって中性糖とシロイノシールを分離することができることになる。

[0153] 分離されたシロイノシール・ホウ酸複合体は乾燥させ、粉末として単離することができる。また、必要があれば、熱水から再結晶することにより、結晶として単離することもできる。

- [0154] 次に、第3の工程では、分離されたシロイノシトール・ホウ酸複合体を酸に溶解する。この溶解により、シロイノシトール・ホウ酸複合体は、シロイノシトールとホウ酸に開裂し、さらに複合体に結合していた金属イオンも溶液中に解離する。この工程で、溶解に用いる酸の種類としては、複合体を溶解することができる限り特に限定されないが、金属イオンの種類によって、溶解度積の低い塩を形成しないものが望ましい。好ましくは塩酸、硫酸、硝酸、リン酸などの鉱酸を用いることができ、より好ましくは塩酸を用いることができる。これらの酸は、溶解によって生じる金属イオンと中和反応を起こすため、シロイノシトール・ホウ酸複合体を溶解した溶液が、最終的に0.1規定以上の酸性溶液となるように調整することが好ましい。また、シロイノシトール・ホウ酸複合体を効率よく溶解させるためには、1規定以上の酸で複合体を溶解し、最終的に0.1規定以上の酸性溶液にすることが好ましい。
- [0155] 第4の工程では、第3の工程で得られた酸性溶液又は酸性懸濁液からシロイノシトールを単離精製する。酸性溶液からシロイノシトールを単離精製する方法は、特に限定されないが、例えば後述するようなイオン交換樹脂等の樹脂を用いる方法、有機溶媒への溶解度差を利用する方法などを用いることができる。
- [0156] また、ホウ酸を遊離させた後、低級アルコールを加え、低級アルコールとホウ酸のエステルとして、減圧留去する方法(Journal of Organic Chemistry、23巻、p.329〜330、1958年)を用いてもよい。
- [0157] これらの方法のうち、イオン交換樹脂を用いたシロイノシトールの単離精製方法は以下のようにして行うことができる。この場合、第3の工程で得られた液体は複合体が完全に溶解した0.1規定以上の酸性溶液であることが好ましい。また、この酸性溶液は、遊離したシロイノシトールが析出しない様にするため、シロイノシトール・ホウ酸複合体の割合が2.5(w/v)%以下になるような容量で酸を加えて調製されたものであることが好ましい。
- [0158] このような酸性溶液を、まず、金属イオンを除去するために強酸性イオン交換樹脂と接触させる。用いる強酸性イオン交換樹脂は、金属イオンを吸着するものであれば特に限定されないが、例えば、硫酸基を有するイオン交換樹脂を挙げることができる。例えば、Duolite C20・H<sup>+</sup>タイプ(住友化学)などを挙げることができる。接触の仕方は

、バッチ的に、一定量の溶液に強酸性イオン交換樹脂を加えて攪拌する操作によって行なっても良いが、カラム状に詰めた強酸性イオン交換樹脂に溶液を通過させて行なう方が望ましい。

[0159] 強酸性イオン交換樹脂により金属イオンが除去された溶液は、次に、ホウ酸を除去するため、強塩基性イオン交換樹脂または、ホウ酸吸着樹脂と接触させる。これらの樹脂は、ホウ酸を吸着するものである特に限定されないが、例えば、強塩基性イオン交換樹脂としては4級アンモニウム基を有するものが挙げられ、ホウ酸吸着樹脂としてはN-メチルグルカミン基を有するものなどが挙げられる。具体的には、強塩基性イオン交換樹脂としてDuolite A116・OH<sup>-</sup>タイプ(住友化学)などを挙げることができる。また、ホウ酸吸着樹脂として具体的には、Duolite ES371N(住友化学)などを挙げることもできる。接触の仕方は、バッチ的に、一定量の溶液にイオン交換樹脂を加えて攪拌する操作によって行なっても良いが、カラム状に詰めたイオン交換樹脂に溶液を加えて行なった方が望ましい。

[0160] 樹脂に接触させる順番は、ホウ酸とシロ-イノシトールが、酸性状態で解離しているため、順不同ではなく、始めに、強酸性イオン交換樹脂、次に、強塩基性イオン交換樹脂またはホウ酸吸着樹脂の順序で接触させる。

[0161] これらの樹脂に接触させて、金属イオン及びホウ酸が除去された溶液には、中性糖であるシロ-イノシトールのみが含まれる。したがって、この溶液を常法によって濃縮してシロ-イノシトールを析出させることによって、精製されたシロ-イノシトールを結晶または粉末として単離できる。

[0162] また、第4の工程において、有機溶媒への溶解度差を利用してシロ-イノシトールを単離精製する場合は、以下のようにして行うことができる。なお、この方法においては、溶解後、有機溶媒添加までの間にイオン交換樹脂等による精製操作を行わないため、第3の工程の酸による溶解によって得られる液体は、溶解液であってもよいが、懸濁液であってもよい。また、第3の工程では、溶解後にシロ-イノシトールが析出しやすくするため、シロ-イノシトール・ホウ酸複合体の割合が2.5% (w/v) 以上、好ましくは3.0%~10% (w/v)、より好ましくは、4.0%~6.0% (w/v) になるような容量で酸を加えることが望ましい。



- [0163] まず、遊離したシロイノシトールを析出させるため、得られた酸性溶液または懸濁液に水溶性有機溶媒を加える。使用される有機溶媒は、ホウ酸が溶解し、酸と塩を形成した金属塩が溶解した状態でシロイノシトールを析出させることのできるものであれば特に限定されないが、例えば、エタノール、メタノールが挙げられる。
- [0164] 有機溶媒の量は、例えば、エタノールを用いる場合、酸性溶液に対して、0.3〜3倍容のエタノールを加えることが好ましく、0.6〜1.5倍容のエタノールを加えることがより好ましい。メタノールを用いる場合、酸性溶液に対して、0.3〜5倍容のメタノールを加えることが好ましく、0.9〜2倍容のメタノールを加えることがより好ましい。特にシロイノシトール・ホウ酸複合体を形成させる時に使用した金属塩が、 $\text{NaCl}$ 、 $\text{NaHCO}_3$ 、 $\text{Na}_2\text{CO}_3$ の内の、いずれか一つ、または、2種類以上である場合においては、これらの容量で有機溶媒を加えることが有効である。さらに、水溶性有機溶媒を加えた後の混合液が、0.1規定以上の酸性溶液になるように調整することが好ましい。
- [0165] 第4の工程において、混合系が、均一溶液の場合は、必ずしも攪拌しなくてもよいが、懸濁液の場合は攪拌したほうが好ましい。また、混合する温度は、シロイノシトールのみが析出する温度であれば、特に限定されないが、好ましくは $-10^{\circ}\text{C}$ 〜 $50^{\circ}\text{C}$ 、より好ましくは $4^{\circ}\text{C}$ 〜 $35^{\circ}\text{C}$ とする。混合する時間は、10分〜24時間が好ましく、3〜5時間がより好ましい。
- [0166] この様な操作によってシロイノシトールのみを析出させることができる。析出したシロイノシトールを、ろ過または、遠心分離などの通常の固液分離操作によって、溶液から分離することができる。得られたシロイノシトールは純粋なものであるが、必要があれば、再結晶などの方法によって、結晶として得ることもできる。より純度を上げるために、析出したシロイノシトールを水に溶解した後、イオン交換樹脂等によってさらに精製してもよい。
- [0167] <4-2>シロイノソースからシロイノシトール・ホウ酸複合体を経ずにシロイノシトールを製造する方法
- 次に、シロイノシトール及びシロイノシトール以外の中性糖を含有する混合液からシロイノシトールを製造する方法のもう一つの形態について説明する。
- この方法は、シロイノソースを含有する溶液中において、シロイノソースを水素化

ホウ素金属塩を用いて還元し、ミオイノシトール及びシロイノシトールを含有する混合液を得る第1の工程、前記混合液に酸を加えて混合液中のシロイノシトール・ホウ酸複合体を溶解させ、かつ溶液を0.01規定以上の酸性溶液に調整する第2の工程、及び前記酸性溶液に、水溶性有機溶媒をミオイノシトールが析出しない量に加えて、シロイノシトールのみを析出させる第3の工程を含む、シロイノシトールの製造方法である。

- [0168] シロイノソースを含有する溶液において、シロイノソースを水素化ホウ素金属を用いて還元した場合、溶液中には、還元されて生じたシロイノシトールとミオイノシトールの他、ホウ酸、および金属イオンが存在するために、シロイノシトールの一部は、水に不溶のシロイノシトール・ホウ酸複合体を形成し、溶液成分のみからシロイノシトールを精製する場合、収率が低下する。第2の発明は、シロイノソースの還元によって得られるミオイノシトール及びシロイノシトールを含有する混合液において、該混合液中に少量生成するシロイノシトール・ホウ酸複合体を酸に溶解し、得られた酸性溶液からシロイノシトールのみを析出させて精製することを目的とする。
- [0169] 第1の工程において、「シロイノソースを含有する溶液」は、例えば、培地や溶液中で微生物を用いてミオイノシトールを酸化することによって得られる(特開2003-102492号公報)ものを使用することができる。微生物酸化によって得られるシロイノソースは、精製した後に溶解して用いてもよいが、培養ろ液を用いてもよい。「シロイノソースを含有する溶液」は、この培養ろ液のようにシロイノソース以外の物質を含むものであってもよい。また、白金触媒でミオイノシトールを酸化して調製したシロイノソースを溶解して使用することもできる。
- [0170] 還元を用いる水素化ホウ素金属は、水系中でシロイノソースをシロイノシトールに還元でき、かつ、ホウ素を遊離することのできる還元剤であれば特に限定されないが、例えば、水素化ホウ素ナトリウム、水素化ホウ素リチウム、水素化ホウ素カリウムを例示することができる。
- [0171] シロイノソースの還元反応は、例えば、20% (w/v) 以下の含量でシロイノソースを溶解した溶液に、還元剤を粉末または、水溶液として添加することで行うことができる。この際に溶液を攪拌することが好ましい。また、還元反応により反応熱が発生する

ことがあるが、生成したイノソースの分解を押さえるために、反応液を50℃以下になるように制御するのが望ましい。さらに、還元剤の一部が分解して水素ガスが発生することがあるが、水素ガスの発泡を押さえるために消泡剤などを添加しておくことが好ましい。

[0172] このようにして、シロイノソースは、シロイノシトールとミオイノシトールに還元され、溶液中にはシロイノシトールとミオイノシトールが混合状態で存在する。この時、シロイノシトールは、濃度が約1.6% (w/v) を超えると、徐々に結晶化を始める。通常、5% (w/v) のシロイノソース水溶液の還元により、約3% (w/v) ミオイノシトール、約2% (w/v) シロイノシトールが生じるが、室温で数時間放置すると、シロイノシトールの過飽和部分の約0.4% (w/v) が結晶化を始める。さらに、シロイノソースの還元により得られたシロイノシトールとミオイノシトールとの混合液には、ホウ酸が含まれるために、シロイノシトールの一部が、シロイノシトール・ホウ酸複合体を形成し始める。第2の発明の製造方法においては、第1の工程の後、直ぐに第2の工程を行ってもよいが、シロイノシトール・ホウ酸複合体は酸処理によって溶解するため、第1の工程の後、しばらく放置した後に第2の工程を行ってもよい。

[0173] 第2の工程は、第1の工程によって得られた「ミオイノシトール及びシロイノシトールを含有する混合液」に酸を加えて、混合液中のシロイノシトール・ホウ酸複合体を溶解し、溶液を0.01規定以上の酸性溶液に調整する。この時、使用される酸は塩酸、硫酸、硝酸、リン酸などの鉱酸を使用することができるが、好ましくは塩酸または硫酸が使用される。

[0174] 第3の工程では、第2の工程で得られる酸性溶液に、ミオイノシトールを析出させず、シロイノシトールのみを析出させる量の水溶性有機溶媒を加える。この時使用される水溶性有機溶媒は、シロイノシトールを析出させ、ミオイノシトールを溶解させた状態を満足するものであれば特に限定されないが、エタノールまたはメタノールまたは1-プロパノールが望ましい。

[0175] ミオイノシトールを析出させず、シロイノシトールのみを析出させる量とは、例えば、酸性溶液に対して、エタノールの場合0.2〜0.4倍容、メタノールの場合0.2〜0.8倍容、1-プロパノールの場合0.2〜0.4倍容であり、好ましくは、酸性溶液に対して、

エタノールの場合0.35〜0.45倍容、メタノールの場合0.45〜0.55倍容、1-プロパノールの場合0.35〜0.45倍容である。

[0176] 水溶性有機溶媒を混合する際には、混合系が、均一溶液の場合は、必ずしも攪拌する必要は無いが、懸濁液の場合攪拌することが好ましい。混合する際の温度は、シロ-イノシトールのみが析出する温度であれば、特に限定されないが、好ましくは−10℃〜50℃、より好ましくは4℃〜35℃である。混合する時間は、好ましくは15〜76時間、より好ましくは、20時間〜24時間である。

[0177] このような条件で水性有機溶媒を混合する場合、シロ-イノシトールのみが析出する。析出したシロ-イノシトールを、ろ過または、遠心分離などの通常の固液分離操作によって、固体として取り出すことができる。この固体は、ほぼ純粋なシロ-イノシトールのみからなるが、必要があれば、再結晶などの方法によって、結晶として得ることもできる。より純度を上げるために、析出したシロ-イノシトールを水に溶解した後、イオン交換樹脂等によってさらに精製してもよい。

[0178] [実施例]

以下、実施例を示して本発明を具体的に説明する。

#### 実施例 1

[0179] <シロ-イノシトールの製造方法(小スケール)>

ミオ-イノシトール 10.0%、酵母エキス 1.0%、シュクロース1.0%を含む液体培地3リットルを、1N NaOHを用いてpH7.0に調製し、100mlずつ500ml容のバツフル付き三角フラスコ30本に分注し、オートクレーブ滅菌した。各々の三角フラスコにアセトバクター・エスピーAB10281株 (FERM BP-10119) のスラント培養物を1白金耳接種し、27℃で5日間ロータリーシェーカーで培養した。培養後、各々の三角フラスコに、水を250mlづつ加え、1時間ロータリーシェーカーで攪拌し、培養液に存在する結晶性のシロ-イノシトールを溶解した。この培養液を集めて、遠心分離(8,000 rpm 20分間)し、上清を培養上清液(10.2L)とした。

[0180] この培養上清液を高速液体クロマトグラフィーにより下記の条件で分析した。その結果、培養上清液中にはシロ-イノシトールが12.6mg/ml (129g、変換率43%)生成していることがわかった。この時の培養上清液中には、シロ-イノソースが2.1mg/ml残存し

、ミオーイノシトールは検出されなかった。

[0181] 高速液体クロマトグラフィーの分析条件は以下の通りである。

カラム: Wakosil 5NH<sub>2</sub> (4.6 × 250 mm)

カラム温度 : 40°C

検出器 : RI DETECTOR ERC-7515A (ERMA CR.INC.)

注入量 : 5 μl

溶媒 : アセトニトリル-水 = 4 : 1

流量 : 2 ml/min

溶出時間 : シローイノソース ; 11.6分

ミオーイノシトール; 17.8分

シローイノシトール; 18.2分

なお、上記のシローイノシトールの変換率は、次式により求めた。

[0182] [数1]

$$\text{変換率(\%)} = \frac{\text{培養上清中のシローイノシトールのモル数}}{\text{培養前のミオーイノシトールのモル数}} \times 100$$

[0183] 次に、培養上清液を、強酸性陽イオン交換樹脂デュオライト(登録商標)C-20 (H<sup>+</sup>型) (住友化学社製) 500mlを充填したカラム(内径5cm、長さ40cm)と活性炭200mlを充填したカラム(内径5cm、長さ16cm)を連結したカラムに通過させ、その後、このカラムに500mlのイオン交換水を通過させて洗浄した。この通過液及び洗浄液を、強塩基性陰イオン交換樹脂デュオライト(登録商標)A116 (OH<sup>-</sup>型) (住友化学社製) 1000mlを充填したカラム(内径7cm、長さ40cm)に通過させ、その後このカラムに1000mlのイオン交換水を通過させて洗浄した。こうして得られた通過液及び水洗浄液中には上記シローイノシトール以外の不純物はほとんど存在していなかった。

[0184] 上記により得た水溶液を減圧下で約700mlまで濃縮し、エタノールを3倍量加え5°Cで一晩放置したところ、純粋なシローイノシトールの無色結晶をろ過し、乾燥させ、118g得た。この時の精製回収率は92%で、ミオーイノシトールからのシローイノシトールの全回収率は39%であった。

## 実施例 2

[0185] <シロイノシトールの製造方法(大スケール)>

ミオイノシトール 10.0%、酵母エキス 1.0%、シュクロース1.0%を含む液体培地40リットルを50L容ジャーファメンターに導入し、1N NaOHを用いてpH7.0に調製し、オートクレーブ滅菌した。同一組成の培地(三角フラスコ)で培養したアセトバクター・エスピールAB10281株(FERM BP-10119)を400ml接種し、27℃で5日間、通気量1vvm、回転数200rpmで培養した。培養後、取り出された培養液約40Lに、約50℃の温水を60L加え、1時間攪拌し、培養液に存在する結晶性のシロイノシトールを溶解した。この培養液を連続遠心分離(8,000 rpm)し、菌体を除去した液を培養除菌液(約100L)とした。

[0186] この培養除菌液を高速液体クロマトグラフィーにより下記の条件で分析した。その結果、培養除菌液中にはシロイノシトールが16.8 mg/ml (1.68kg、変換率42%)生成していることがわかった。この時の培養除菌液中には、シロイノソースが2.9mg/ml残存し、ミオイノシトールは検出されなかった。なお、高速液体クロマトグラフィーの分析条件は実施例1と同様である。

[0187] 次に、得られた100Lの溶液に、水酸化ナトリウム400gを加えて、攪拌下で加熱し、98℃、1時間処理を行なった。次に液体が熱いうちに、水酸化ナトリウム560g、ホウ酸1340g、NaCl 1260gを加えて、溶解させた。攪拌を止めて、この溶液を放熱させ、23℃になるまで放置した(約24時間)。

[0188] 次に、液体中に形成したシロイノシトールホウ酸複合体の結晶を単離するために、この溶液をろ過し、結晶を水で白色になるまで、洗浄した。得られた結晶(約3.9kg)は、別の容器に取りだし、これに水5.9L、37%塩酸1.95Lを加え、攪拌した。30分後、この操作で、ホウ酸を遊離したシロイノシトールをさらに沈殿させるため、メタノールを9.4L加え、さらに、1時間攪拌した。

[0189] 次に、液体中に結晶化したシロイノシトールを単離するために、この溶液をろ過し、結晶を50%メタノール1Lで洗浄した。得られた微粉の結晶(約1.8kg)は、別の容器に取りだし、これに水10Lを加え、攪拌しながら、温度をかけて、1時間煮沸した。その後、この溶液を攪拌しながら冷却し、20℃になった段階で、ろ過して、シロイノシトール微結晶を得た。乾燥後、純粋なシロイノシトールの無色結晶を1.35kg得た。この

時の精製回収率は80%で、ミオーイノシトールからのシローイノシトールの全回収率は34%であった。

### 実施例 3

#### [0190] <シローイノシトール生成菌の16SrRNA塩基配列による同定>

ミオーイノシトールをシローイノシトールに変換する能力を有する3つの自然分離菌株、AB10285株、AB10286株、AB10287株、および、AB10253株より育種されたAB10281株の計4菌株の16SrRNA塩基配列解析は、常法に従って行なった。すなわち、培養後の菌体からゲノムDNAを抽出後、16SrRNAの約1.6kbpが増幅できる様に設計されたプライマーを用いてPCR法により、相当するDNA断片を調製し、約1.3kbp相当のシーケンスを解析(北海道システムサイエンス社)した。その配列結果を元にデータベースと照合し、近縁種を同定した。

[0191] 表2に、照合結果、相同性、実施例1と同様に培養した時のシローイノシトールへの変換率を示した。

[0192] [表2]

16SrRNA塩基配列解析による菌株同定

系統名	同定菌名	相同性	変換率
AB10281	<i>Acetobacter cerevisiae</i> , <i>Acetobacter malorum</i>	99.93%	40.0%
AB10285	<i>Acetobacter cerevisiae</i> , <i>Acetobacter malorum</i>	99.78%	4.5%
AB10286	<i>Burkholderia andropogonis</i>	98.12%	2.6%
AB10287	<i>Burkholderia andropogonis</i>	98.04%	1.4%

[0193] この結果から、ミオーイノシトールをシローイノシトールに変換する能力を有する4種類の菌株は大きく2群に分けることができることが判る。第1群として、AB10281株とAB10285株は、アセトバクター・セルビスエ(*Acetobacter cerevisiae*)、または、アセトバクター・マローラム(*Acetobacter malorum*)であると同定され、また、第2群として、AB10286株とAB10287株は、バークホルデルリア・アンドロポゴニス(*Burkholderia andropogonis*)であると同定された。

### 実施例 4

[0194] <アセトバクター・エスピーAB10253株からのNAD<sup>+</sup>非依存のミオーイノシトール2-デヒドロゲナーゼの単離>

500ml容ワッフル付き三角フラスコに、ミオーイノシトール3g、酵母エキス(FNI205:

Lallemand BI社製) 1g、グルコース0.5gを加え、100mlになる様に水に溶解し、pH5.0に調整し、オートクレーブにより滅菌した培地を4本作製し、これに、アセトバクター・エスピーAB10253株をスラントから、それぞれ1白金耳加えて、2日間、27℃、ロータリーシェーカーでプレ培養した。

[0195] 次に、50リットル容ジャーファメンターに、ミオイノシトール1.2kg、酵母エキス(FNI205:Lallemand BI社製)0.4kg、グルコース0.2kgを加え、40リットルになる様に水に溶解し、pH5.0に調整し、オートクレーブにより滅菌した。これにプレ培養したアセトバクター・エスピーAB10253株の菌液約400mlを加えて、3日間、27℃、通気量1vvm、回転数200rpmで培養した。

[0196] 培養後、連続遠心機を用いて、菌体を沈殿として得た。得られた菌体は水2リットルに再懸濁し、遠心分離によって、洗浄菌体を得た後に、20mMトリス緩衝液pH7.0 2リットルに懸濁した。次に、この懸濁液に超音波を照射し、菌体を破碎した。菌体破碎液は、破碎した菌体を沈殿させるため、遠心分離を行ない、沈殿物として、破碎菌体を得た。この沈殿物に、20mMトリス緩衝液pH7.0、0.6% TritonX-100 (Kodak社製) 500mlを加えて、懸濁し、3時間、15℃で酵素を抽出した。その後、遠心分離を行ない、上清の粗酵素液420mlを取り出した。

[0197] 粗酵素液420mlは、限外ろ過装置 (MW30000cut off) によって150mlまで濃縮し、この濃縮液を、20mMのトリス緩衝液 (pH7.0) で平衡化したDEAEトヨパールカラム 400mlを通過させ、タンパク質を吸着させた。カラムに吸着させたタンパク質は次に、界面活性剤を含まない20mMのトリス緩衝液 (pH7.0) に、NaCl 0mMから、500mMの直線濃度勾配をかけた溶液 (総量1.6リットル) を1分間に10mlの速度で通過させ、タンパク質を溶出させた。溶出液は40mlずつの画分に分画した。次に、このカラムを、再度、界面活性剤を含まない20mMのトリス緩衝液 (pH7.0) 600mlを通して、洗浄し、次に0.1% TritonX-100を含む20mMのトリス緩衝液 (pH7.0) に、NaCl 0mMから、500mMの直線濃度勾配をかけた溶液 (総量1.6リットル) を1分間に10mlの速度で通過させ、タンパク質を溶出させた。溶出液は40mlずつの画分に分画した。

[0198] 各画分の酵素活性の測定は、標準的な方法として、タンパク溶液50  $\mu$  lに100mMリン酸緩衝液 (pH5.0)、ミオイノシトール5mg、2, 4-ジクロロインドフェノール (酸化型



DCIP) 0.4mgからなる1ml溶液の600nmの吸収度変化を反応速度に換算して、1分間あたり、1  $\mu$  molのミオーイノシトールが酸化される活性を1ユニットとして測定した。

- [0199] その結果、本酵素は、0.1% TritonX-100を含む20mMのトリス緩衝液 (pH7.0)、NaCl 100-170mMの溶液画分に溶出することが判った。次に、この画分 (240ml) を集めて、限外ろ過装置 (MW30000cut off) によって30mlまで濃縮し、0.1% TritonX-100を含む20mMのトリス緩衝液 (pH7.0) 100mlを加えてさらに濃縮し、30mlまで濃縮された溶液に、20mMのトリス緩衝液 (pH7.0) を70ml加えて、脱塩を行なった。
- [0200] この様にして調製した酵素液は次に、0.1% TritonX-100を含む20mMのトリス緩衝液 (pH7.0) で平衡化したヒドロキシアパタイトカラム100mlを通過させ、タンパク質を吸着させた。カラムに吸着させたタンパク質は、次に、0.1% TritonX-100を含むトリス緩衝液 (pH7.0) に、リン酸緩衝液 (pH7.0) を0mMから、500mMの直線濃度勾配をかけた溶液 (総量400ml) を1分間に3mlの速度で通過させ、タンパク質を溶出させた。溶出液は10mlずつの画分に分画し、各画分の酵素活性を測定した。
- [0201] その結果、本酵素は、0.1% TritonX-100を含む20mMのトリス緩衝液 (pH7.0)、リン酸緩衝液 100-170mMの溶液画分に溶出することが判った。この様にして得られた酵素液は、ほぼ、純粋なNAD<sup>+</sup>非依存ミオーイノシトール2-デヒドロゲナーゼを含んでいた。次に、この画分 (40ml) を集めて、限外ろ過装置 (MW30000cut off) によって5mlまで濃縮し、20mMのトリス緩衝液 (pH7.0) 100mlを加えてさらに5mlまで濃縮し、脱塩を行なった。
- [0202] この様にして調製されたこの濃縮液を、再度、0.1% TritonX-100を含む20mMのトリス緩衝液 (pH7.0) で平衡化したDEAEトヨパールカラム (東ソー社製) 20mlを通過させ、タンパク質を吸着させた。カラムに吸着させたタンパク質は次に、0.1% TritonX-100を含む20mMのトリス緩衝液 (pH7.0) に、NaCl 50mMから、250mMの直線濃度勾配をかけた溶液 (総量160ml) を1分間に1mlの速度で通過させ、タンパク質を溶出させた。溶出液は4mlずつの画分に分画した。分画後、各画分の酵素活性測定と、活性のある各画分のSDS電気泳動を行なった。
- [0203] その結果、本酵素の酵素活性と相関性のあるタンパク質のバンドがSDS電気泳動から、明らかになった。前後の活性のない画分に由来するタンパク質のバンドを除去す

ると、本酵素は、少なくとも分子量約76kダルトンと約46kダルトンのタンパク質を含有する酵素であることが判明した。

[0204] また、酵素の活性のある画分は赤色の色を有し、UVスペクトルパターンからチトクロムCを含有することが判った。さらに目的タンパク質の含有量と、チトクロムCの吸光度から本酵素1モルには1モルのチトクロムCが含有されていることが判明した。

[0205] 至適pHの測定は、酵素活性測定の際、緩衝液及びpHを変えて測定を行なった。緩衝液は、100mMリン酸緩衝液(pH3〜8)、100mMトリス緩衝液(pH7〜8)及び100mM炭酸緩衝液(pH8〜11)を用いた。その結果、本酵素はpH4.5〜5.5に極大活性を有することが判った。さらに、標準的酵素活性測定(100mMリン酸緩衝液(pH5.0))の際に、各種重金属イオン( $\text{Sn}^{2+}$ 、 $\text{Mn}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 、 $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Fe}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$ 、 $\text{Co}^{2+}$ 、 $\text{Pb}^{2+}$ 、 $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Cd}^{2+}$ 、 $\text{Ni}^{2+}$ )を加えて測定したところ、本酵素は、 $\text{Sn}^{2+}$ イオンにより特異的に阻害されることが判った。酵素活性は、1mMの $\text{Sn}^{2+}$ イオン存在下において、 $\text{Sn}^{2+}$ イオン非存在下の活性の1%以下まで阻害された。

[0206] また、本酵素は膜画分から、TritonX-100によって抽出される酵素であり、抽出酵素は、還元型DCIP存在下に、ミオ-イノシトールを酸化するが、還元型DCIP非存在下では酸素吸収は起きないことを確認した。このことは、生体中で細胞膜電子伝達系と共役し、ミオ-イノシトールから電子を奪いシロ-イノソースを生成することを意味する。

[0207] 本酵素の基質特異性は、ミオ-イノシトールの代わりに各種糖を最終濃度50mM含む溶液で酵素活性を測定した。また、活性のある糖について、糖の濃度を変えて酵素活性を測定し、 $K_m$ 値を測定した。さらに、酸化反応物をHPLCで分析して、どのような物質が生成するかを測定した。HPLC条件は、カラムにWakosil5NH2カラム  $\phi$  4.6×250mm(カラム温度40℃)、移動相に80%アセトニトリル(流速2ml/min)、検出器にRI検出器を用いて測定した。

[0208] 結果として、本酵素は、D-キロ-イノシトール(相対活性100%: $K_m$ =8.8mM)、ムコ-イノシトール(相対活性68%: $K_m$ =14.5mM)、ミオ-イノシトール(相対活性53%: $K_m$ =20mM)に反応し、D-キロ-1-イノソース、L-キロ-2-イノソース、シロ-イノソースへ、それぞれ、変換する。アロ-イノシトール、シロ-イノシトール、L-キロ-イノシト

ール、グルコースには反応しないことが判った。

## 実施例 5

- [0209] <NAD<sup>+</sup>非依存のミオーイノシトール2-デヒドロゲナーゼによるミオーイノシトールのシロイノソースへの変換>

実施例4と同様にして、40Lジャーファメンターから精製を行ない、途中のヒドロキシアパタイトカラム100mlにより精製、脱塩を行なった5mlの酵素溶液を、酵素液として、以下の変換反応を行なった。

- [0210] 400ml容の遠心チューブに、ミオーイノシトール30g (166.7mmol)、1Mリン酸緩衝液 (pH5.0) 15mlを加えて300mlに水で希釈して、ミオーイノシトールを溶解させた。これに、30℃で、酵素液1mlを加えて攪拌しながら、還元型DCIP (Na塩) 8gを徐々に加えた。還元型DCIPに由来する青色が消失した後、青色の消失と共に生じる白色の不溶物 (酸化型DCIP) を遠心分離で沈殿させ、上清を新たな400ml容の遠心チューブに移しかえた。さらに本溶液を1規定リン酸によりpHを5.0に調製し、攪拌しながら、さらに還元型DCIP (Na塩) を8gずつ加えた。この操作を、6回繰返し、合計48gの還元型DCIP (Na塩) 加え、青色が消失した段階で、最後に3gの還元型DCIP (Na塩) を加え、1時間放置後、遠心分離により、上清を取り出した。このような操作によって、上清292mlを得た。操作時間は8時間を要した。

- [0211] 次に、得られた上清は、カラムに詰めた強酸性イオン交換樹脂 (DuoliteC20、H<sup>+</sup>タイプ) 100mlに溶解液を1分間に1.5mlの流速で通過させ、得られた溶出液を、カラムに詰めた弱塩基性イオン交換樹脂 (Duolite368S、OH<sup>-</sup>タイプ) 150mlに通過させ、さらに、得られた溶出液を、カラムに詰めた活性炭50mlに通過させた。得られた溶出液を濃縮し、白色粉末26.5g (148.9 mmol) を得た (収率89%)。本物質をNMRと、HPLCにより分析した結果、本物質には、シロイノソースが99%、ミオーイノシトール1%が含まれていた。

## 実施例 6

- [0212] <NAD<sup>+</sup>非依存性ミオーイノシトール2-デヒドロゲナーゼ活性を指標にした、アセトバクター・エスピーAB10253株の変異株からのスクリーニング>

試験管に入れた酵母エキス (Difco社製) 1%、グルコース0.5%を含むpH5.0の液体

培地5mlを滅菌し、これに、スラントからアセトバクター・エスピーAB10253株を1白金耳加えて、27℃、16時間、振盪培養を行なった。培養液2.5mlを滅菌チューブにとり出し、3000×gの遠心分離を行ない、菌体を集菌した。上清を捨て、200mMリン酸緩衝液(pH8.0)2.5mlに再度懸濁し、3000×gの遠心分離を行ない、菌体を集菌した。上清を捨て、200mMリン酸緩衝液(pH8.0)2.5mlに再度懸濁し、この内、2.0mlを、滅菌した100ml容の三角フラスコに入れ、0.5mlの40%グルコース溶液と、7.5mlの200mMリン酸緩衝液(pH8.0)を加え混ぜ合わせ、これに、20 $\mu$ lのメタンスルホン酸エチルを加えて、30℃、45分間、振とう培養を行なった。処理後、1mlを滅菌チューブにとり出し、3000×gの遠心分離を行ない、菌体を集菌した。上清を捨て、200mMリン酸緩衝液(pH7.0)2.5mlに懸濁し、3000×gの遠心分離を行ない、菌体を集菌する。上清を捨て、200mMリン酸緩衝液(pH7.0)2.5mlに再度懸濁し、変異処理菌液を得た。

[0213] これらの変異処理を施したアセトバクター・エスピーAB10253株は、次に、3%ミオイノシトール、酵母エキス(Difco社製)1%、グルコース0.5%、1.5%寒天を含むpH5.0の培地を滅菌し、9cm径のシャーレ中で固化させた寒天培地に、シャーレ1枚当たり、変異処理菌液0.12mlを広げて、27℃、2日間培養した。この操作によって、生菌数は約1.6%に減少した。また、シャーレ1枚当たり約95〜125コロニーが形成した。

[0214] 培養後、9cm径のシャーレに形成したコロニーの上に、100mMリン酸緩衝液、1%ミオイノシトール、0.4%酸化型DCIPからなる組成液をろ過滅菌し、これに、オートクレーブ滅菌した1%寒天を熱いうちに等量混合し、36℃まで冷却後、寒天が固まらない様に調製した粘稠な溶液を10mlゆっくりと注ぎ入れた。このような処理を行なった寒天培地は、27℃でゆっくりと冷却され、9cm径のシャーレに形成したコロニーの上に、重層された形で、固化した。

[0215] 処理後、27℃で、シャーレをインキュベートすることにより、徐々にNAD<sup>+</sup>非依存ミオイノシトール2-デヒドロゲナーゼ活性の大きさに従って、寒天培地上に一面に広がった酸化型DCIPの青色が、コロニーのまわりのみ、透明になり始めるのが観察された。この時、より速く、透明になった所のコロニーを、滅菌した針でつついて、新しい培地に継代し、1次選抜で、全コロニー数2154コロニーから、NAD<sup>+</sup>非依存ミオイノシトール2-デヒドロゲナーゼ活性の高い株を22株、取得することができた。

[0216] 次に、試験管に入れた3%ミオーイノシトール、酵母エキス(Difco社製)1%、グルコース0.5%を含むpH5.0の液体培地5mlを滅菌した培地に、2次選抜として、上記で得た22株のコロニーを形成した菌を、それぞれ植菌した。27℃、3日間、振盪培養を行なった後、培養液1mlを試験管に取りだし、3000×gの遠心分離を行ない、菌体を集菌した。上清を捨て、菌体の入った試験管に10%ミオーイノシトール、50mMリン酸緩衝液(pH5.0)を含む溶液を1ml加え、27℃、4時間、振盪培養を行なった後、16000×gの遠心分離を行ない、上清に含まれるミオーイノシトールからシロイノソースの変換率をHPLCで測定した。一方、培養液5mlの内、0.5mlを滅菌チューブに取りだし、3000×gの遠心分離を行ない、上清を捨て、沈殿の菌体は水で洗浄後、NAD<sup>+</sup>非依存ミオーイノシトール2-デヒドロゲナーゼ活性を測定した。

[0217] その結果、22株の変異株のうち、変異前の菌と比べて、NAD<sup>+</sup>非依存ミオーイノシトール2-デヒドロゲナーゼ活性が1.3倍以上に増加した菌株は、3株(系統No. E6-55、H2-68、B7-14)あり、それぞれ、1.6倍、2.2倍、2.8倍に増加していた。またこれらの、ミオーイノシトールからシロイノソースの変換率は、それぞれ、1.1倍、1.4倍、1.5倍に増加しており、NAD<sup>+</sup>非依存ミオーイノシトール2-デヒドロゲナーゼ活性が1.3倍以下の株のミオーイノシトールからシロイノソースの変換率は、変異前の菌と同等であった。このことから、NAD<sup>+</sup>非依存ミオーイノシトール2-デヒドロゲナーゼ活性を指標にしたスクリーニングは、ミオーイノシトールからシロイノソースの変換率の増加と相関性があることがわかった。

## 実施例 7

[0218] <変異菌株(B7-14)を用いたミオーイノシトールからシロイノソースの変換によるシロイノソースの製造>

500ml容ワッフル付き三角フラスコに、ミオーイノシトール10g、酵母エキス(FNI205: Lallemand BI社製)1g、グルコース0.5gを加え、100mlになる様に水に溶解し、pH5.0に調整し、オートクレーブにより滅菌した培地を20本(2リットル相当:ミオーイノシトール200g(1.11mol))作製し、これに、変異菌株(B7-14)をスラントから、それぞれ1白金耳加えて、3日間、27℃、ロータリーシェーカーで培養した。

[0219] 培養後、培養液を遠心分離し、得られた上清は、カラムに詰めた強酸性イオン交換

樹脂 (DuoliteC20、H<sup>+</sup>タイプ) 500mlに溶解液を1分間に10mlの流速で通過させ、得られた溶出液を、カラムに詰めた弱塩基性イオン交換樹脂 (Duolite368S、OH<sup>-</sup>タイプ) 900mlに通過させ、さらに、得られた溶出液を、カラムに詰めた活性炭50mlに通過させた。得られた溶出液を濃縮し、白色粉末162g (0.91mol)を得た (収率82%)。本物質をNMRと、HPLCにより分析した結果、本物質には、シローイノソースが91%、ミオーイノシトール3%、シローイノシトール6%が含まれていた (シローイノソース純度91%)。

### 実施例 8

[0220] <変異菌株 (B7-14) を用いたミオーイノシトールからシローイノソースの変換と化学還元によるシローイノシトールの製造>

500ml容ワッフル付き三角フラスコに、ミオーイノシトール10g、酵母エキス (FNI205: Lallemand BI社製) 1g、グルコース0.5gを加え、100mlになる様に水に溶解し、pH5.0に調整し、オートクレーブにより滅菌した培地を20本 (2リットル相当: ミオーイノシトール200g (1.11mol)) 作製し、これに、変異菌株 (B7-14) をスラントから、それぞれ1白金耳加えて、3日間、27℃、ロータリーシェーカーで培養した。

[0221] 培養後、培養液を8000×gで遠心分離し、得られた上清約2リットルを、5規定NaOH溶液を用いて、pH7.5に調整した。これに攪拌しながら、NaBH<sub>4</sub> 9.2gを加えて還元反応を行なった。反応熱で反応液の温度は37℃に上昇した。30分後、不溶物が徐々に現れ、ここに1.2リットルの水を加えて、発生する不溶物を殆ど溶解した。この溶液をろ過し、不溶物を取り除いたろ液は、カラムに詰めた強酸性イオン交換樹脂 (DuoliteC20、H<sup>+</sup>タイプ) 500mlに溶解液を1分間に10mlの流速で通過させ、得られた溶出液を、カラムに詰めた強塩基性イオン交換樹脂 (DuoliteA116、OH<sup>-</sup>タイプ) 900mlに通過させ、さらに、得られた溶出液を、カラムに詰めた活性炭300mlに通過させた。得られた溶出液を濃縮し、白色粉末145gを得た。本物質をHPLCにより分析した結果、本物質には、シローイノシトールが36%、ミオーイノシトール64%が含まれていた。

[0222] 得られた白色粉末を、水で470mlになるように懸濁し、70℃に加熱し、ミオーイノシトールを十分溶解させた。30℃まで攪拌しながら冷却し、白濁した溶液をろ過して、不

溶物を集めた。不溶物は少量の水で洗浄し、乾燥後、44.2gの粉末として得られた。本物質をHPLCにより分析した結果、本物質には、シロイノシールが98%、ミオイノシール2%が含まれていた。さらに、得られた粉末に700mlの水を加えて、85℃に加熱し、全て溶解させ、徐々に攪拌しながら、30℃まで冷却し、ここにエタノールを700ml加えた。一晩、室温で放置後、得られた結晶をろ過して集め、乾燥後、40.1g(222.8mmol)の結晶を得た(収率20%)。結晶をNMRおよびHPLCにより分析した結果、本物質は、99.9%以上の純度のシロイノシールであった。

### 実施例 9

[0223] <アセトバクター・エスピー AB10281株 FERM BP-10119の産生するシロイノシールデヒドロゲナーゼの精製>

ミオイノシール 10.0%、酵母エキス 1.0%、シュクロース1.0%を含む液体培地3リットルを、1N NaOHを用いてpH7.0に調製し、100mlずつ500ml容のバッフル付き三角フラスコ30本に分注し、オートクレーブ滅菌した。各々の三角フラスコにアセトバクター・エスピー AB10281株 FERM BP-10119のスラント培養物を1白金耳接種し、27℃で5日間ロータリーシェーカー(180rpm)を用いて培養した。培養後、各々の三角フラスコに、水を250mlずつ加え、1時間ロータリーシェーカーで攪拌し、培養液に存在する結晶性のシロイノシールを溶解した。この培養液を集めて、遠心分離(8,000 rpm 20分間)し、菌体(湿重量75g)を得た。

[0224] この菌体を300mlの水に懸濁し、10℃以下で超音波で破碎した。破碎溶液は、pH4.8を示し、この溶液を1NのNaOHでpH7.0に調製した後に、遠心分離(16,000 rpm 20分間)により、上清液を単離した。次に、上清液が2mM  $Mg^{2+}$ になるように $MgSO_4$ を加えて、ブルートヨパールカラム(東ソー社:20ml)にチャージし、2mM  $Mg^{2+}$ になるように添加した20mMトリス緩衝液pH7.0 50mlを通過させ、カラムを洗浄した。その後、1M KClになるように添加した20mMトリス緩衝液pH7.0 50mlを通過させ、吸着タンパクを溶出させた。次に、溶出液をMW30000cut offの限外ろ過装置で、濃縮を行ない、濃縮液に、20mMトリス緩衝液pH7.0 50mlを加えて、再度濃縮し、脱塩濃縮液を得た。次に、この脱塩濃縮液を、DEAEトヨパールカラム(東ソー社:20ml)にチャージし、20mMトリス緩衝液pH7.0 から、500mM NaClになるように添加した20mMトリ

ス緩衝液pH7.0の直線濃度勾配をかけた溶液で溶出し、溶出液をフラクション別に分画した。分画した溶液別に、シロイノシトールデヒドロゲナーゼ活性を測定したところ、吸着しなかった画分(SIDH1)、200mM NaClで溶出した画分(SIDH2)、300mMで溶出した画分(SIDH3)の三つの画分にそれぞれ、活性があった。

[0225] 活性測定は、反応液(200mMトリス緩衝液pH8.0、2%NADPH、1%シロイノソース)5  $\mu$ lと、酵素液5  $\mu$ lを混合し、36℃、30min反応後、ただちに、500  $\mu$ lの水を加えて、340nmの吸光度を測定し、酵素液の代わりに水を用いた試験液のブランク値から、340nmの吸光度の減少量を測定した。必要があれば、酵素液は希釈を行なった。

[0226] 上記カラム非吸着画分は、さらに、CMトヨパールカラム(東ソー社:20ml)にチャージし、20mMトリス緩衝液pH7.0から、500mM NaClになるように添加した20mMトリス緩衝液pH7.0の直線濃度勾配をかけた溶液で溶出し、溶出液をフラクション別に分画した。分画した溶液別に、シロイノシトールデヒドロゲナーゼ活性を測定したところ、吸着しなかった画分に、活性があった。200mM NaClで溶出した画分、300mMで溶出した画分は、それぞれ別々に、再度限外ろ過装置で脱塩し、DEAEトヨパールカラム(東ソー社:20ml)にチャージし、200mM NaClになるように添加した20mMトリス緩衝液pH7.0から、300mM NaClになるように添加した20mMトリス緩衝液pH7.0の直線濃度勾配をかけた溶液で溶出し、溶出液をフラクション別に分画し、精製した。さらに、これら三つのシロイノシトールデヒドロゲナーゼ活性を有する酵素液を、それぞれ、限外ろ過装置で濃縮し、ゲルろ過カラム(東ソー社:2000SW<sub>XL</sub>)にチャージし、溶出液に200mM NaClになるように添加した20mMリン酸緩衝液pH7.0を用いて、精製した。このように精製された酵素液をスラブゲルSDS電気泳動し、電気泳動後ゲルを取り出し、コマシブリリアントブルー染色液(ラピッドCBB KANTO:関東化学社製)で染色後脱色し、青く染まるタンパク質のバンドをデンスitomーター(ATTO社製)で測定し、目的のバンドの純度を測定したところ、いずれも純度85%以上であった。

## 実施例 10

[0227] <大腸菌K12株 ATCC10798が産生する本発明酵素の精製と、N末端分析>

L-ソルボース 0.5%を含む、LBブロス培地(1%バクトトリプトン、0.5%酵母エキス、1%NaCl、pH7.0)3リットルを、100mlずつ500ml容の坂口フラスコ30本に分注し、オー



トクレーブ滅菌した。各々の三角フラスコに大腸菌K12株のスラント培養物を1白金耳接種し、36℃で1日間レシプロシェーカー(135rpm)で培養した。培養後、培養液を集めて、遠心分離(8,000 rpm 20分間)し、菌体(湿重量32g)を得た。この菌体を100mlの水に懸濁し、10℃以下で超音波で破碎した。破碎溶液は、pH6.8を示し、この溶液を1NのNaOH溶液で、pH7.0に調製した後に、遠心分離(16,000 rpm 20分間)により、上清液を単離した。次に、上清液が2mM  $Mg^{2+}$ になるように $MgSO_4$ を加えて、ブルートヨパールカラム(東ソー社:20ml)にチャージし、2mM  $Mg^{2+}$ になるように添加した20mMトリス緩衝液pH7.0 50mlを通過させ、カラムを洗浄した。その後、1M KClになるように添加した20mMトリス緩衝液pH7.0 50mlを通過させ、吸着タンパクを溶出させた。次に、溶出液をMW30000cut offの限外ろ過装置で、濃縮を行ない、濃縮液に、20mMトリス緩衝液pH7.0 50mlを加えて、再度濃縮し、脱塩濃縮液を得た。次に、この脱塩濃縮液を、DEAEトヨパールカラム(東ソー社:20ml)にチャージし、20mMトリス緩衝液pH7.0 から、500mM NaClになるように添加した20mMトリス緩衝液pH7.0の直線濃度勾配をかけた溶液で溶出し、溶出液をフラクション別に分画した。分画した溶液別に、シロイノシトールデヒドロゲナーゼ活性を測定したところ、300mMで溶出した画分に活性があった。

[0228] 活性測定は、実施例9で上述した方法と同様で、340nmの吸光度の減少量を測定した。必要があれば、酵素液は希釈を行なった。

[0229] 300mM NaClで溶出した画分は、再度限外ろ過装置で脱塩し、DEAEトヨパールカラム(東ソー社:20ml)にチャージし、250mM NaClになるように添加した20mMトリス緩衝液pH7.0 から、350mM NaClになるように添加した20mMトリス緩衝液pH7.0の直線濃度勾配をかけた溶液で溶出し、溶出液をフラクション別に分画する操作を3回行ない、共雑するタンパク質を除き、精製した。さらに、このシロイノシトールデヒドロゲナーゼ活性を有する酵素液を、それぞれ、限外ろ過装置で濃縮し、ゲルろ過カラム(東ソー社:2000SW<sub>XL</sub>)にチャージし、溶出液に200mM NaClになるように添加した20mMリン酸緩衝液pH7.0を用いて、精製した。

[0230] このように精製された酵素液をスラブゲルSDS電気泳動後、ゲルを取り出し、ゲルと同じ大きさのPVDF膜(イモビロンPSQ:ミリポア社製)にセミドライエレクトロブロット

装置(フナコシ社製)で吸着させた後、このPVDF膜を取り出し、コマシブリリアントブルー染色液(ラピッドCBB KANTO: 関東化学社製)で染色後脱色し、実施例9で記述した方法と同様にデンストメーターで純度を測定したところ、純度が40%であった。さらに、前後に存在する不要なタンパク質を除くため、相当するタンパク質部分を切り取り、純度の高い、本発明酵素を得た。

- [0231] 次に、PVDF膜にある純度の高い、本発明酵素を、N末端アミノ酸分析装置(Hewlett Packard社)により、分析を行なった。その結果、セリンーアスパラギン酸ーアスパラギンーイソロイシンーアルギニンの配列が検出され、このような配列を有するタンパク質をコードするDNAを大腸菌全塩基配列データベース(データベース名「Colibri」)から検索したところ、ydgJ遺伝子(またはb1624遺伝子)が一致した。本遺伝子産物は酸化還元酵素の一種であると予想されているが、基質、生産物は全く不明のタンパク質であった。

#### 実施例 11

- [0232] <大腸菌K12株 ATCC10798由来の本発明DNAの単離と発現>

本発明酵素をコードしていると思われるydgJ遺伝子を取得するために、まず、鋳型とする大腸菌K12株の全ゲノムを以下の様に抽出した。LBフラスコ培地100ml(1%バクトートリプトン、0.5%酵母エキス、1%NaCl、pH7.0)にLBスラント培地(1%バクトートリプトン、0.5%酵母エキス、1%NaCl、pH7.0、1.5%寒天)で培養した大腸菌K12株を一白金耳接種し、8時間、36℃で好氣的に培養し、これを集菌した。この菌体ペレットに、15mlのSaline-EDTA溶液(0.15M NaCl、0.1M EDTA、pH8.0)とリゾチーム50mgを加えて懸濁し、37℃、2時間作用させた。処理後、この溶液に25%SDS溶液を0.5ml加えて完全に溶菌させ、フェノールを3ml加えて、タンパク質を変性させた後に、遠心分離し、上清を取り出し、この溶液に20mlの2-プロパノールを加えて、粗ゲノムDNAを析出させた。析出した粗ゲノムDNAを遠心分離し、沈殿させ、上清を取り除いた後、減圧下で乾燥させた。乾燥した粗ゲノムDNAは、さらに3ml TE液(10mM Tris-HCl、1mM EDTA、pH8.0)に溶解後、0.01mgのRNAaseを加え、36℃、2時間反応させ、RNAを分解させた。さらに、0.01mgのプロテイナーゼKを加えて、36℃、2時間反応させ、タンパク質を分解させた。次に、1mlのフェノールークロロホルム

(1:1)混液を加えて、ゆっくりと攪拌し、RNAaseと、プロテイナーゼKを変成させ、遠心分離し、2相に分離した内の水相である上層を取り出し、これに3M酢酸Na溶液を0.3ml加えて、pH5.2に調製した。これに3mlの2-プロパノールを加えて、ゲノムDNAを析出させた。析出したゲノムDNAを遠心分離し、沈殿させ、上清を取り除いた後、減圧下で乾燥させた。乾燥したゲノムDNAは、3mlTE液に溶解させ、これに1mlのフェノールクロロホルム(1:1)混液を加える操作から、3mlTE液に溶解させる過程までを、再度繰り返して、遠心分離を行い、同様にpH5.2にて、上清に等量の2-プロパノールを加えて、大腸菌K12株のゲノムDNA溶液を調製した。このようにして得られたゲノムDNAをPCR反応のための鋳型DNA溶液とした。

- [0233] 大腸菌K12株由来で、ydgJ遺伝子のリボソームバインディングサイト(RBS)を含む範囲をクローニングし、かつ、リコンビナント酵素として発現させるために、以下の配列を有するプライマーを用いて、PCR反応を行った。

配列番号15:ydgj-F 5'- cattcaagcttaatgagaggcaatgacatgagcg-3'

配列番号16:ydgj-R 5'- tcggaattcttcatgcaaggcacaaagtcgc-3'

- [0234] PCR反応は宝酒造社のEx taq反応用液を使用し、組成はTakara ExTaq Buffer×10倍液 5 $\mu$ l、dNTP mixture 4 $\mu$ l、鋳型DNA 30ng、10 $\mu$ M プライマー溶液 各1 $\mu$ l、Takara ExTaq 0.5 $\mu$ lを50 $\mu$ lになるように水を加え、30 $\mu$ lのミネラルオイルを重層し、調製した。反応条件は、PCR増幅装置(ASTEC社 PC-700)を用い、変成を94℃30秒、アニーリングを55℃1分、伸長を72℃1分、の3段階の反応を35回繰り返した。上記のPCR反応によって、約1.0 kbpの大きさのDNA断片が増幅した。反応後、重層したミネラルオイルを0.3mlのヘキサンで抽出し、ヘキサン層を除去する操作を3回繰り返し、1分間減圧することで、ミネラルオイルを除去した。この様にして得られた反応液50 $\mu$ lからジーンクリーン(Bio101社)を用いてPCR断片を精製した。すなわち、キット添付のNaI溶液を300 $\mu$ l加えて混合し、10 $\mu$ lガラスビーズ溶液を加えて混合し、4℃、15分静置した後に、遠心分離し、DNA断片の吸着したガラスビーズを沈殿させ、上清を除去した。さらに、キット添付のNew wash溶液500 $\mu$ lを加えて、ガラスビーズを懸濁させ、遠心分離し、上清を除去した。このNew wash溶液による洗浄操作は3回繰り返した。次に、ガラスビーズを減圧下で乾燥させ、乾燥後、15 $\mu$ lの滅菌水を加えて、

懸濁し、55℃で、15分加温した後、遠心分離を行い、DNA断片を含む上清12  $\mu$  lを得た。

[0235] 精製されたDNA断片を発現ベクターに組み込む操作は以下の用に行った。すなわち、DNA断片溶液10  $\mu$  lに、発現用プラスミド(pUC119:宝酒造社製)を0.5  $\mu$  g、宝酒造社の制限酵素HindIIIとEcoRIを各1  $\mu$  l、宝酒造社の制限酵素用緩衝液K buffer  $\times$ 10倍液 2  $\mu$  lを加え、20  $\mu$  lになるように滅菌水を加え、混合した。この反応液を36℃、2時間反応した。制限酵素反応後、ジーンクリーンを用いて、DNA断片と発現ベクターを単離し、これらをライゲーションさせた。すなわち、制限酵素反応液20  $\mu$  lにキット添付のNaI溶液を300  $\mu$  l加えて混合し、10  $\mu$  lガラスビーズ溶液を加えて混合し、4℃、15分静置した後に、遠心分離し、DNA断片と発現ベクターの吸着したガラスビーズを沈殿させ、上清を除去した。さらに、キット添付のNew wash溶液500  $\mu$  lを加えて、ガラスビーズを懸濁させ、遠心分離し、上清を除去した。このNew wash溶液による洗浄操作は3回繰り返した。次に、ガラスビーズを減圧下で乾燥させ、乾燥後、15  $\mu$  lの滅菌水を加えて、懸濁し、55℃で、15分加温した後、遠心分離を行い、DNA断片と発現ベクターを含む上清12  $\mu$  lを得た。この操作により、制限酵素によって生じた約50bp以下の小さなDNA断片は取り除かれ、目的とするDNA断片と、発現ベクターが得られた。

[0236] このようにして調製した溶液10  $\mu$  lにTakara Ligation kit-I溶液(宝酒造社)を10  $\mu$  l加え、16℃、1時間反応させた。この溶液を、コンピテントセル(宝酒造社:DH5  $\alpha$ )に形質転換させた。すなわち、4℃で解凍したコンピテントセル溶液60  $\mu$  lにライゲーション反応溶液を5  $\mu$  l加え、混合し、0℃30分後、42℃45秒、0℃2分の処理を行い、これに500  $\mu$  l SOC溶液(2%バクトトリプトン、0.5%酵母エキス、10mM NaCl、20mM グルコース、10mM MgSO<sub>4</sub>、10mM MgCl<sub>2</sub>)を加えて、36℃で1時間回復培養させ、この培養液100  $\mu$  lを、50  $\mu$  g/mlアンピシリン、40  $\mu$  g/ml X-gal(5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- $\beta$ -D-Galactoside)、1mM IPTG(チオガラクトピラノシド)を含むLB寒天培地(1%バクトトリプトン、0.5%酵母エキス、1%NaCl、pH7.0、1.5%寒天)に塗布した。さらに37℃、16時間培養した。この培養により白色に発色したコロニーとして前記のプラスミドの導入で形質転換された大腸菌が得られるため、これ

を選択した。こうして分離した形質転換大腸菌コロニーをアンピシリン (50  $\mu$ g/ml) を含むLB液体培地で培養した。増殖した形質転換大腸菌の菌体からプラスミド精製キット (QIA filter Plasmid Midi Kit, QIAGEN社) によりプラスミドDNAの分離および精製を行った。こうして得られたプラスミドDNAは、目的とするydgJ遺伝子に相当する約1.0kbpのDNA断片を有することが確認された。

[0237] 次に、シロイノシトールデヒドロゲナーゼ活性を確認するため、コロニーとして単離した菌株を50  $\mu$ g/mlアンピシリンを含む100ml LB培地 (1%バクトトリプトン、0.5%酵母エキス、1%NaCl、pH7.0) に移植し、36℃7時間培養し、この培養液に200mMチオガラクトピラノイド溶液を0.3ml加え、さらに36℃3時間培養した。培養終了後、遠心分離により、菌体を集め、これを生理食塩水で1回洗浄した。さらに、洗浄菌体を0.6%トライトンX100溶液3mlに懸濁し4℃で超音波により菌を破碎した。この溶液を遠心分離し、上清の酵素溶液2.8mlを取り出し、上清に1.2g硫酸を加え、4℃でタンパク質を塩析させた。塩析したタンパク質を遠心分離 (15, 000rpm、20min) で集め、上清を除去し、この沈殿物を2.5mlの20mMトリス緩衝液 pH7.0に溶解させ、再度遠心分離 (15, 000rpm、20min) を行い、上清を20mMトリス緩衝液 pH7.0で平衡化したShephadex G-25カラム (ファルマシア社: 14ml) にアプライし、20mMトリス緩衝液 pH7.0で溶出させ、脱塩を行なった。この操作により、ydgJ遺伝子産物の粗酵素液3.5mlを得た。

[0238] シロイノシトールデヒドロゲナーゼの活性測定は、反応液 (200mMトリス緩衝液 pH8.0、2%NADPH、1%シロイノソース) 5  $\mu$ lと、酵素液5  $\mu$ lを混合し、36℃、30min反応後、ただちに、500  $\mu$ lの水を加えて、340nmの吸光度を測定し、酵素液の代わりに水を用いた試験液のブランク値から、340nmの吸光度の減少量を測定した。必要があれば、酵素液は希釈を行なった。

[0239] また、酵素反応生産物の測定は、シロイノソース10mg、NADPH40mg、酵素10U相当を含む100mMトリス緩衝液 (pH8.0) 1.0mlで、36℃、4時間反応後、80℃、10minの加熱処理を行ない、冷却後、強塩基性陽イオン交換樹脂100  $\mu$ l、強酸性陰イオン交換樹脂100  $\mu$ l、活性炭10mgを加えて攪拌し、遠心分離後、上清を2倍希釈し、HPLC (Shodex Asahipak NH2P-50 4E  $\phi$  4.6×250mm: Shodex社) を用いて、カラム温度

40℃、移動相流速1.5ml(80%アセトニトリル)の条件下、RI検出器で測定した。その結果、ydgJ遺伝子産物は、高いシロ-イノシトールデヒドロゲナーゼ活性を示し、その生産物は、100%シロ-イノシトールへ還元されたものであり、異性体であるミオ-イノシトールは検出されなかった。結果として、ydgJ遺伝子由来のリコンビナント酵素溶液は、高いシロ-イノシトールデヒドロゲナーゼ活性を有し、この遺伝子産物が、シロ-イノシトールデヒドロゲナーゼであることを確認した。また、シロ-イノソースからの還元反応物は、シロ-イノシトールのみ検出され、立体特異的に、シロ-イノシトールへ還元する酵素であった。また、ydgJ遺伝子の配列は配列番号1に、相当するアミノ酸配列は配列番号2に記載した。

## 実施例 12

[0240] <大腸菌ydgJ遺伝子の相同性から推定されるホモログDNAの単離と発現、およびその諸性質>

大腸菌ydgJ遺伝子産物のアミノ酸配列から三次元構造を推定すると、グルコース-フルクトースオキシドレダクターゼのファミリーに属することが推定された。このファミリーにはミオ-イノシトール2-デヒドロゲナーゼ(EC1.1.1.18)も含まれ、アミノ酸配列の内、NAD結合に関与する配列は、相同性が高いことが判った。さらに、グルコース-フルクトースオキシドレダクターゼのX線構造解析から、基質結合に関与する個所のアミノ酸配列を特定し、部分的に同じアミノ酸配列を有し、ydgJ遺伝子産物に相同なタンパク質を検索したところ、グラム陰性菌、陽性菌を問わず、多くの細菌に相同なタンパク質があることが判明した。

これらの細菌の中から、大腸菌ydgJ遺伝子の相同性から推定されるホモログDNAを検索した結果、アグロバクテリウム チュメファシエンスC58株 ATCC33970(*Agrobacterium tumefaciens* C58 ATCC33970)ゲノム中のAtu4375遺伝子と、Atu3234遺伝子、バチルス ズブチリス168株 ATCC23857(*Bacillus subtilis* 168 ATCC23857)ゲノム中のBG14057遺伝子、キサントモナス キャンペストリス pv. キャンペストリス株 ATCC33913(*Xanthomonas campestris* pv. *campestris* ATCC33913)ゲノム中のXcc3438遺伝子ならびに、ミオ-イノシトールから直接にシロ-イノシトールへ変換する能力のある微生物も知られているアグロバクテリウム・エスピーAB10121株

FERM P-17383 (*Agrobacterium* sp. AB10121 FERM P-17383) ゲノム中のAtu4375 遺伝子と、Atu3234 遺伝子について大腸菌 ydgJ 遺伝子との相同性が認められた。従って、それぞれのDNAの単離と発現を行なった。

- [0241] 上記の候補DNAを得る目的で、鋳型とするアグロバクテリウム チュメファシエンス C58株 ATCC33970、バチルス ズブチリス168株 ATCC23857、キサントモナス キャンペストリス pv. キャンペストリス株 ATCC33913および、アグロバクテリウム・エスピーAB10121株 FERM P-17383の全ゲノムを以下の様に抽出した。アグロバクテリウム チュメファシエンスC58株、キサントモナス キャンペストリス pv. キャンペストリス株および、アグロバクテリウム・エスピーAB10121株は、LBフラスコ培地100ml(1%バクトトリプトン、0.5%酵母エキス、1%NaCl、pH7.0)に、LBスラント培地(1%バクトトリプトン、0.5%酵母エキス、1%NaCl、pH7.0、1.5%寒天)で培養したアグロバクテリウム チュメファシエンスC58株、キサントモナス キャンペストリス pv. キャンペストリス株および、アグロバクテリウム・エスピーAB10121株をそれぞれ、一白金耳接種し、18時間、27℃で好氣的に培養し、これを集菌した。この菌体ペレットに、15mlのSaline-EDTA溶液(0.15M NaCl、0.1M EDTA、pH8.0)とリゾチーム50mgを加えて懸濁し、37℃、2時間作用させた。処理後、この溶液に25%SDS溶液を0.5ml加えて完全に溶菌させ、フェノールを3ml加えて、タンパク質を変性させた後に、遠心分離し、上清を取り出し、この溶液に20mlの2-プロパノールを加えて、粗ゲノムDNAを析出させた。析出した粗ゲノムDNAを遠心分離し、沈殿させ、上清を取り除いた後、減圧下で乾燥させた。乾燥した粗ゲノムDNAは、さらに3mlTE液(10mM Tris-HCl、1mM EDTA、pH8.0)に溶解後、0.01mgのRNAaseを加え、36℃、2時間反応させ、RNAを分解させた。さらに、0.01mgのプロテイナーゼKを加えて、36℃、2時間反応させ、タンパク質を分解させた。次に、1mlのフェノールクロロホルム(1:1)混液を加えて、ゆっくりと攪拌し、RNAaseと、プロテイナーゼKを変性させ、遠心分離し、2相に分離した内の水相である上層を取り出し、これに3M酢酸Na溶液を0.3ml加えて、pH5.2に調製した。これに3mlの2-プロパノールを加えて、ゲノムDNAを析出させた。析出したゲノムDNAを遠心分離し、沈殿させ、上清を取り除いた後、減圧下で乾燥させた。乾燥したゲノムDNAは、3mlTE液に溶解させ、これに1mlのフェノールーク

ロロホルム(1:1)混液を加える操作から、3ml TE液に溶解させる過程までを、再度繰り返して、遠心分離を行い、同様にpH5.2にて、上清に等量の2-プロパノールを加えて、アグロバクテリウム チュメファシエンシスC58株、キサントモナス キャンペストリス pv. キャンペストリス株および、アグロバクテリウム・エスピーAB10121株のゲノムDNA溶液をそれぞれ、調製した。このようにして得られたゲノムDNAをPCR反応のための鋳型DNA溶液とした。

[0242] バチルス ズブチリス168株 ATCC23857は、LBフラスコ培地100ml(1%バクト-トリプトン、0.5%酵母エキス、1%NaCl、pH7.0)にLBスラント培地(1%バクト-トリプトン、0.5%酵母エキス、1%NaCl、pH7.0、1.5%寒天)で培養したバチルス ズブチリス168株を一白金耳接種し、18時間、36℃で好氣的に培養し、さらに、この内、1mlを同様に調製したLBフラスコ培地100mlに加えて、4時間培養し、これを集菌した。集菌後の全ゲノムの抽出方法は、アグロバクテリウムで使用した方法と同様である。

[0243] 次に、アグロバクテリウム チュメファシエンシスC58株ゲノム中のAtu4375遺伝子、Atu3234遺伝子、アグロバクテリウム・エスピーAB10121株ゲノム中のAtu4375遺伝子、Atu3234遺伝子、キサントモナス キャンペストリス pv. キャンペストリス株ゲノム中のXcc3438遺伝子、のRBSを含むクローニング、かつ、リコンビナント酵素として発現させるために、以下の配列を有するプライマーを用いて、PCR反応を行った。

配列番号17:Atu4375-F 5'- ggcggatcctttgaaagggatagtcatgtcct -3'

配列番号18:Atu4375-R 5'- attggaagcttcgattggctgacgacctag -3'

配列番号19:Atu3234-F 5'- ttgggatcctttcaggggaaatattatggc -3'

配列番号20:Atu3234-R 5'- gccgcaagcttgttttacagcttcac -3'

配列番号23:Xcc3438-F 5'- tcggaattcgcttgcggtgaatcggtttcaatg -3'

配列番号24:Xcc3438-R 5'- ataagaagcttgctcagtcgctgctgttccttc -3'

[0244] バチルス ズブチリス168株ゲノム中のBG14057遺伝子のRBSを含むクローニング、かつ、リコンビナント酵素として発現させるために、以下の配列を有するプライマーを用いて、PCR反応を行った。但し、5'末端から10番目のaは本来tであるが大腸菌での発現のためaに変更した。

配列番号21:BG14057-F 5'- aggaattcgatgataacgcttttaaaggggagaa -3'



配列番号19:Atu3234-F 5'- ttggatcctttcaggggaaatattatggc -3'

配列番号20:Atu3234-R 5'- gccgcaagcttgtttacagcttcac -3'

配列番号23:Xcc3438-F 5'- tcggaattcgcggtgcggtgaatcggtttcaatg -3'

配列番号24:Xcc3438-R 5'- ataagaagcttgctcagtcgctgctgttccttc -3'

- [0244] バチルス ズブチリス168株ゲノム中のBG14057遺伝子のRBSを含むクローニング、かつ、リコンビナント酵素として発現させるために、以下の配列を有するプライマーを用いて、PCR反応を行った。但し、5'末端から10番目のaは本来tであるが大腸菌での発現のためaに変更した。

配列番号21:BG14057-F 5'- aggaattcgatgataacgcttttaaggggagaa -3'

配列番号22:BG14057-R 5'- ttctgcagtttagtgctccagcataatggttcg -3'

- [0245] PCR反応は宝酒造社のEx taq反応用液を使用し、組成はTakara ExTaq Buffer×10倍液 5 $\mu$ l、dNTP mixture 4 $\mu$ l、鋳型DNA 30ng、10 $\mu$ M プライマー溶液 各1 $\mu$ l、Takara ExTaq 0.5 $\mu$ lを50 $\mu$ lになるように水を加え、30 $\mu$ lのミネラルオイルを重層し、調製した。反応条件は、PCR増幅装置 (ASTECC社 PC-700)を用い、変成を94℃で30秒、アニーリングを52℃、55℃または58℃(表3参照)で1分、伸長を72℃で1分、の3段階の反応を35回繰返し行った。上記のPCR反応によって、約1.1 kbpの大きさのDNA断片が増幅した。

- [0246] [表3]

<表3 アニーリング温度一覧>

対象遺伝子	アニーリング温度
Agrobacterium tumefaciens C58ATCC33970のAtu4375遺伝子用	55℃
Agrobacterium AB10121 FERM P-17383のAtu4375遺伝子用	55℃
Agrobacterium tumefaciens C58ATCC33970のAtu3234遺伝子用	52℃
Agrobacterium AB10121 FERM P-17383のAtu3234遺伝子用	52℃
Bacillus subtilis 168ATCC23857のBG14057遺伝子用	55℃
Xanthomonas campestris pv. Campestris ATCC33913のXcc3438遺伝子用	58℃

- [0247] 反応後、重層したミネラルオイルを0.3mlのヘキサンで抽出し、ヘキサン層を除去する操作を3回繰返し、1分間減圧することで、ミネラルオイルを除去した。この様にして得られた反応液50 $\mu$ lからジーンクリーン (Bio101社)を用いてPCR断片を精製した。すなわち、キット添付のNaI溶液を300 $\mu$ l加えて混合し、10 $\mu$ lガラスビーズ溶液を加えて混合し、4℃、15分静置した後に、遠心分離し、DNA断片の吸着したガラスビー

ズを沈殿させ、上清を除去した。さらに、キット添付のNew wash溶液500  $\mu$  lを加えて、ガラスビーズを懸濁させ、遠心分離し、上清を除去した。このNew wash溶液による洗浄操作は3回繰り返した。次に、ガラスビーズを減圧下で乾燥させ、乾燥後、15  $\mu$  lの滅菌水を加えて、懸濁し、55°Cで、15分加温した後、遠心分離を行い、DNA断片を含む上清12  $\mu$  lを得た。

- [0248] 精製されたDNA断片を発現ベクターに組み込む操作は、それぞれ以下に示す組合せで、行った。すなわち、DNA断片溶液10  $\mu$  lに、発現用プラスミド(pUC118:宝酒造社製)を0.5  $\mu$  g、宝酒造社の制限酵素2種類を各1  $\mu$  l、宝酒造社の制限酵素用緩衝液buffer×10倍液 2  $\mu$  lを加え、20  $\mu$  lになるように滅菌水を加え、混合した。この反応液を36°C、2時間反応した。AB10121株のAtu3234遺伝子は、HindIIIサイトを有するため、制限酵素処理せず、単離後、pT7Blueベクター (Novagen社製) とライゲーションさせた。

[0249] [表4]

〈表4 発現用プラスミド、使用した制限酵素一覧〉

対象遺伝子	発現用プラスミド	使用した制限酵素
A. tume. C58のAtu4375遺伝子用	pUC118	BamH I、HindIII / K buffer
AB10121株のAtu4375遺伝子用	pUC118	BamH I、HindIII / K buffer
A. tume. C58のAtu3234遺伝子用	pUC118	BamH I、HindIII / K buffer
AB10121株のAtu3234遺伝子用	pT7Blue	未使用
B. sub. 168のBG14057遺伝子用	pUC118	EcoR I、Pst I / H buffer
X. camp. のXcc3438遺伝子用	pUC118	EcoR I、HindIII / K buffer

- [0250] 制限酵素反応後、ジーンクリーンを用いて、DNA断片と発現ベクターを単離し、これらをライゲーションさせた。すなわち、制限酵素反応液20  $\mu$  lにキット添付のNaI溶液を300  $\mu$  l加えて混合し、10  $\mu$  lガラスビーズ溶液を加えて混合し、4°C、15分静置した後、遠心分離し、DNA断片と発現ベクターの吸着したガラスビーズを沈殿させ、上清を除去した。さらに、キット添付のNew wash溶液500  $\mu$  lを加えて、ガラスビーズを懸濁させ、遠心分離し、上清を除去した。このNew wash溶液による洗浄操作は3回繰り返した。次に、ガラスビーズを減圧下で乾燥させ、乾燥後、15  $\mu$  lの滅菌水を加えて、懸濁し、55°Cで、15分加温した後、遠心分離を行い、DNA断片と発現ベクターを含む上清12  $\mu$  lを得た。この操作により、制限酵素によって生じた約50bp以下の小さなDNA断片は取り除かれ、目的とするDNA断片と、発現ベクターが得られた。

%寒天)に塗布した。さらに37℃、16時間培養した。この培養により白色に発色したコロニーとして前記のプラスミドの導入で形質転換された大腸菌が得られるため、これを選択した。こうして分離した形質転換大腸菌コロニーをアンピシリン(50  $\mu$ g/ml)を含むLB液体培地で培養した。増殖した形質転換大腸菌の菌体からプラスミド精製キット(QIA filter Plasmid Midi Kit, QIAGEN社)によりプラスミドDNAの分離および精製を行った。こうして得られたプラスミドDNAは、それぞれ、目的とするDNAに相当する約1.0～1.1kbpのDNA断片を有することが確認された。

[0252] 次に、シロ-イノシトールデヒドロゲナーゼ活性を確認するため、コロニーとして単離した菌株を50  $\mu$ g/mlアンピシリンを含む100ml LB培地(1%バクトトリプトン、0.5%酵母エキス、1%NaCl、pH7.0)に移植し、36℃7時間培養し、この培養液に200mMチオガラクトピラノシド溶液を0.3ml加え、さらに36℃、3時間培養した。培養終了後、遠心分離により、菌体を集め、これを生理食塩水で1回洗浄した。さらに、洗浄菌体を0.6%トライトンX100溶液3mlに懸濁し4℃で超音波により菌を破碎した。この溶液を遠心分離し、上清の酵素溶液2.8mlを取り出し、上清に1.2g硫酸を加え、4℃でタンパク質を塩析させた。塩析したタンパク質を遠心分離で集め、上清を除去し、この沈殿物を2.5mlの20mMトリス緩衝液 pH7.0に溶解させ、再度遠心分離を行い、上清を20mMトリス緩衝液 pH7.0で平衡化したShephadex G-25カラム(14ml)にアプライし、20mMトリス緩衝液 pH7.0で溶出させ、脱塩を行なった。この操作により、それぞれの遺伝子産物の粗酵素液3.5mlを得た。

[0253] シロ-イノシトールデヒドロゲナーゼの活性測定は、反応液(200mMトリス緩衝液 pH8.0、2%NADPH、1%シロ-イノソース)5  $\mu$ lと、酵素液5  $\mu$ lを混合し、36℃30min反応後、ただちに、500  $\mu$ lの水を加えて、340nmの吸光度を測定し、酵素液の代わりに水を用いた試験液のブランク値から、340nmの吸光度の減少量を測定した。必要があれば、酵素液は希釈を行なった。

[0254] また、酵素反応生産物の測定は、シロ-イノソース10mg、NADPH40mg、酵素10U相当を含む100mMトリス緩衝液(pH8.0)1.0mlで、36℃で4時間反応後、80℃、10minの加熱処理を行ない、冷却後、強塩基性陽イオン交換樹脂100  $\mu$ l、強酸性陰イオン交換樹脂100  $\mu$ l、活性炭10mgを加えて攪拌し、遠心分離後、上清を2倍希釈し、HPLC

(Shodex Asahipak NH2P-50 4E  $\phi$  4.6×250mm:Shodex製)にて、カラム温度40℃、移動相流速1.5ml(80%アセトニトリル)、RI検出器で測定した。その結果、アグロバクテリウム チュメファシエンスC58株のAtu4375遺伝子産物と、Atu3234遺伝子産物、バチルス ズブチリス168株のBG14057遺伝子産物、キサントモナス キャンペストリス pv. キャンペストリス株のXcc3438遺伝子産物、ならびに、AB10121株のAtu4375遺伝子産物と、Atu3234遺伝子産物は、高い酵素活性を示し、その生産物は、すべて、100%シロ-イノシトールへ還元されたものであり、異性体であるミオ-イノシトールは検出されなかった。結果として、上述した遺伝子由来のリコンビナント酵素は、全て高いシロ-イノシトールデヒドロゲナーゼ活性を有し、この遺伝子産物が、シロ-イノシトールデヒドロゲナーゼであることを確認した。また、シロ-イノソースからの還元反応物は、シロ-イノシトールのみ検出され、立体特異的に、シロ-イノシトールへ還元する酵素であった。

- [0255] アグロバクテリウム チュメファシエンスC58株由来のAtu4375遺伝子配列は配列番号3に、相当するアミノ酸配列は配列番号4に、Atu3234遺伝子配列は配列番号5に、相当するアミノ酸配列は配列番号6に記載した。また、バチルス ズブチリス168株由来のBG14057遺伝子配列は配列番号7に、相当するアミノ酸配列は配列番号8に、AB10121株由来のAtu4375遺伝子配列は配列番号9に、相当するアミノ酸配列は配列番号10に、Atu3234遺伝子配列は配列番号11に、相当するアミノ酸配列は配列番号12に、キサントモナス キャンペストリス pv. キャンペストリス株由来のXcc3438遺伝子配列は配列番号13に、相当するアミノ酸配列は配列番号14に記載した。また、AB10121株のAtu4375遺伝子と、Atu3234遺伝子を含むプラスミドの塩基配列解析(北海道システムサイエンス社)の結果、アグロバクテリウム チュメファシエンスC58株のAtu4375遺伝子と、AB10121株のAtu4375遺伝子とは、塩基配列上の相同性は89%、アミノ酸配列上の相同性は96%であり、アグロバクテリウム チュメファシエンスC58株のAtu3234遺伝子と、AB10121株のAtu3234遺伝子の塩基配列上の相同性は87%、アミノ酸配列上の相同性は95%であった。

### 実施例 13

- [0256] <アセトバクター・エスピー AB10281株 FERM BP-10119の産出するSIDH1をコー

ドするDNAの単離>

精製された酵素の内、SIDH1を含む酵素液をPVDF膜(イモビロンPSQ:ミリポア社製)を通過させ、PVDF膜に吸着させた。このPVDF膜を取りだし、コマシブリリアントブルー染色液(ラピッドCBB KANTO:関東化学社製)で染色後脱色し、乾燥後、N末端アミノ酸分析装置(Hewlett Packard社)により分析を行なった。その結果、N末端から、メチオニン-リジン-アルギニン-リジン-ロイシン-アルギニン-イソロイシン-グリシン-ロイシン-イソロイシン-グリシン-セリン-グリシン-フェニルアラニン-メチオニン-グリシン-アルギニン-スレオニン-ヒスチジン-アラニン-フェニルアラニン-グリシン-チロシン-セリンの配列が検出され、このアミノ酸配列をコードするDNA配列を想定し、以下の2種類のプライマーを作製した。

配列番号29:SIDH1-F1 atgaarcgnaarytncgiatyggyytiatygg

配列番号30:SIDH1-F2 ggyttyatgggycgnacicaygcittyggyta

[0257] 次に、実施例10〜12で得られた各種シロイノシールデヒドロゲナーゼの塩基配列を元に、配列内部のコンセンサスの強い領域を含む以下の2種類のプライマーを作製した。

配列番号31:SIDH1-B1 ggyttrtcrmmgayracrtgrstrcc

配列番号32:SIDH1-B2 artgwirtgrttgggigt

また、鋳型となるAB10281株のゲノムDNAは、実施例9で調製した菌体ペレット(湿重量約400mg)を対象に、実施例12に記載したDNA調製方法と同様の方法で、AB10281株のゲノムDNA溶液を調製した。

PCR反応は宝酒造社のEx taq反应用液を使用し、組成はTakara ExTaq Buffer×10倍液 5 $\mu$ l、dNTP mixture 4 $\mu$ l、鋳型DNA 30ng、10 $\mu$ M プライマー溶液 各1 $\mu$ l (SIDH1-F1と、SIDH1-B1)、Takara ExTaq 0.5 $\mu$ lを50 $\mu$ lになるように水を加え、30 $\mu$ lのミネラルオイルを重層し、調製した。反応条件は、PCR増幅装置(ASTEC社 PC-700)を用い、変成を94℃30秒、アニーリングを50℃30秒、伸長を72℃1分、の3段階の反応を35回繰返し行った。上記のPCR反応によって、電気泳動後、約0.3kbpの大きさのDNA断片が増幅したことを確認した。さらに、この0.3kbpのバンドをゲルから切りだし、ゲル破碎溶液の一部を鋳型(2 $\mu$ l)として、プライマーの組合せを

SIDH1-F2と、SIDH1-B2にした以外は、同様のPCR反応液組成で反応液を調製し、反応条件は、PCR増幅装置 (ASTECH社 PC-700)を用い、変成を94℃30秒、アニーリングを46℃30秒、伸長を72℃1分、の3段階の反応を35回繰返し行った。このPCR反応によって、電気泳動後、約0.25kbpの大きさのDNA断片が増幅したことを確認した。

約0.25kbpの大きさのDNA断片は、この部分をゲルから切り出し、ジーンクリーン (Bio101社製)を用いてPCR断片を精製した。すなわち、ゲルをNaI溶液に溶解させる以外は、実施例12に記載の精製方法と同様の方法で、DNA断片溶液12  $\mu$  lを得た。

[0258] 次に、精製されたDNA断片をpT7Blueベクターとライゲートさせた。すなわち、DNA断片溶液10  $\mu$  lに、pT7Blueベクターを0.5  $\mu$  g、Takara Ligation kit-I溶液 (宝酒造社)を10  $\mu$  l加え、16℃、1時間反応させた。この溶液を、コンピテントセル (宝酒造社 DH5  $\alpha$ ) に形質転換させた。形質転換操作、形質転換からのプラスミドの単離は実施例12と同様の方法で行った。

得られたプラスミドを、ユニバーサルプライマー (R-20merと、U-19mer)を用いて、塩基配列解析 (北海道システムサイエンス社)したところ、この酵素をコードする遺伝子の塩基配列の前半約1/3が明らかになった。

さらに、完全長の塩基配列を決定するため、AB10281株のゲノムDNAを制限酵素 BamHIで完全に消化させ、得られたDNA断片溶液を、ジーンクリーン (Bio101社製)を用いて精製し、この断片をセルフライゲートさせた。すなわち、DNA断片溶液10  $\mu$  lに、Takara Ligation kit-I溶液 (宝酒造社)を10  $\mu$  l加え、16℃、1時間反応させた。反応後、ジーンクリーン (Bio101社製)を用いて、このDNAを精製し、インバースPCR用の鋳型DNA溶液とした。

[0259] 次に、明らかになった前半約1/3の塩基配列を元に、以下の3種類のプライマーを作製し、インバースPCR反応を行なった。

配列番号33:SIDH1-INV-F gctcgtcaacgatcctgaaattgat

配列番号34:SIDH1-INV-B ttcgctgcagcttcacgcgaaatat

配列番号35:SIDH1-INV-F3 cccttcaatttcgggcggt

インバースPCR反応は宝酒造社のEx taq反応用液を使用し、組成はTakara ExTaq Buffer  $\times$  10倍液 5  $\mu$  l、dNTP mixture 4  $\mu$  l、鋳型DNA 30ng、10  $\mu$  M プライマー溶

液 各1  $\mu$ l (SIDH1-INV-FとSIDH1-INV-Bの組合せ、SIDH1-INV-FとSIDH1-INV3の組合せ)、Takara ExTaq 0.5  $\mu$ lを50  $\mu$ lになるように水を加え、30  $\mu$ lのミネラルオイルを重層し、調製した。反応条件は、PCR増幅装置 (ASTECS社 PC-700)を用い、変成を94°C30秒、アニーリングを50°C1分、伸長を72°C2分、の3段階の反応を35回繰返し行った。上記のPCR反応によって、電気泳動後、約2.7kbpと、約1.8kbpの大きさのDNA断片が増幅した。この約2.7kbpと、約1.8kbpのバンドをゲルから切りだし、ジーンクリーン (Bio101社製)を用いてPCR断片を精製し、DNA断片溶液10  $\mu$ lを得た。得られたDNA断片2種類を、PCRで使用したプライマーを用いて、塩基配列解析 (北海道システムサイエンス社)を行ない、この酵素をコードする遺伝子の全塩基配列を決定した。

[0260] 次に、AB10281株の産出するSIDH1遺伝子のRBSサイトを含むクローニング、かつ、リコンビナント酵素として発現させるために、以下の配列を有するプライマーを用いて、PCR反応を行った。

配列番号36:281SIDH1-F    gctggatcccgcccttattgtgaata

配列番号37:281SIDH1-R    tatgaattcggtatgccttctcatgctgtcg

PCR反応は宝酒造社のEx taq反応用液を使用し、組成はTakara ExTaq Buffer  $\times$  10倍液 5  $\mu$ l、dNTP mixture 4  $\mu$ l、鋳型DNA 30ng、10  $\mu$ M プライマー溶液 各1  $\mu$ l、Takara ExTaq 0.5  $\mu$ lを50  $\mu$ lになるように水を加え、30  $\mu$ lのミネラルオイルを重層し、調製した。反応条件は、PCR増幅装置 (ASTECS社 PC-700)を用い、変成を94°C30秒、アニーリングを55°C1分、伸長を72°C1分、の3段階の反応を35回繰返し行った。上記のPCR反応によって、約1.2 kbpの大きさのDNA断片が増幅した。

約1.2kbpの大きさのDNA断片は、ジーンクリーン (Bio101社製)を用いて精製され、DNA断片溶液12  $\mu$ lを得た。このDNA断片を発現ベクターに組み込む操作は、DNA断片溶液10  $\mu$ lに、発現用プラスミドを0.5  $\mu$ g (pUC119)、宝酒造社の制限酵素 (BamH1、EcoRI)を各1  $\mu$ l、宝酒造社の制限酵素用緩衝液K buffer  $\times$  10倍液 2  $\mu$ lを加え、20  $\mu$ lになるように滅菌水を加え、混合した。この反応液を36°C、2時間反応した。

反応溶液からのDNA断片の回収、精製、ライゲーション反応、および、コンピテント

セル(宝酒造社DH5 $\alpha$ )への形質転換は実施例12と同様の方法で行った。さらに、シロイノシトールデヒドロゲナーゼ活性を確認するための、酵素の発現と、活性測定方法も実施例12と同様の方法で行い、本遺伝子産物が、シロイノシトールデヒドロゲナーゼであることを確認した。

結果として、AB10281株の産出するSIDH1をコードする遺伝子の塩基配列を配列番号27に、また、アミノ酸配列を配列番号28に記載した。

#### 実施例 14

##### [0261] <本発明酵素である各種シロイノシトールデヒドロゲナーゼの諸性質の検討>

実施例9の酵素精製により得られたAB10281株由来のSIDH1、SIDH2、SIDH3と、実施例11のリコンビナント酵素として得られた大腸菌由来のydgJ遺伝子産物と、実施例12のリコンビナント酵素として得られたアグロバクテリウム チュメファシエンシC58株のAtu4375遺伝子産物と、Atu3234遺伝子産物、バチルス ズブチリス168株のBG14057遺伝子産物、キサントモナス キャンペストリス pv. キャンペストリス株のXcc3438遺伝子産物、ならびに、AB10121株のAtu4375遺伝子産物と、Atu3234遺伝子産物の酵素としての諸性質を以下に示す方法で検討し、その結果を表5に記載した。

[0262] また、表6はアミノ酸配列の相同性を示した表であり、全てに共通したアミノ酸だけの相同性は、約5%で低い相同性であるが、似た性質を有するアミノ酸まで含めると、特にN末端の前半約30%のNADまたはNADP結合ドメインは、相同性が高いことが判った。さらにNADまたはNADPの酸化還元作用部位であるニコチンアミドの結合に関与する配列中央前半寄りのリジン-プロリン配列はよく保存されていた。リジン-プロリン配列からC末端側へ27番目のアスパラギンと、配列中央付近のアスパラギン酸-(3アミノ酸)-ヒスチジン配列もよく保存されており、推定三次元構造から基質結合に関与する重要な配列と考えられる。表中、共通した配列は「\*」印で、性質の似たアミノ酸は「:」印、または「.」印で表示し、さらに、リジン-プロリン配列、リジン-プロリン配列からC末端側へ27番目のアスパラギン、配列中央付近のアスパラギン酸-(3アミノ酸)-ヒスチジン配列は網掛けで示した。

[0263] 分子量の比較は、AB10281株由来の本発明酵素は、分子量マーカー(プレステイ



ン・スタンダード(ブロードレンジタイプ):バイオラッド社製)を指標としたSDS-PAGEの結果から、他の本発明酵素は遺伝子の全長から推定される酵素の分子量を算出した。その結果、酵素精製により得られたAB10281株由来の本発明酵素SIDH1、SIDH2、SIDH3の分子量は、それぞれ46kダルトン、42kダルトン、40kダルトンであった。また、実施例11のリコンビナント酵素として得られた大腸菌K-12株由来のydgJ遺伝子由来の本発明酵素の分子量は38.2kダルトン、実施例12のリコンビナント酵素として得られたアグロバクテリウム チュメファシエンスC58株のAtu4375遺伝子、Atu3234遺伝子由来の本発明酵素の分子量はそれぞれ41.3kダルトン、42.4kダルトン、バチルス ズブチリス168株のBG14057遺伝子、キサントモナス キャンペストリス pv. キャンペストリス株のXcc3438遺伝子、ならびに、AB10121株のAtu4375遺伝子、Atu3234遺伝子由来の本発明酵素の分子量はそれぞれ40.1kダルトン、38.5kダルトン、41.4kダルトン、42.5kダルトンであった。つまり、本発明酵素である各種シロイノシトールデヒドロゲナーゼは38〜46kダルトンの分子量を示すことが判明した。

[0264] 本発明酵素の会合特性は、ゲルろ過カラム(東ソー社:2000SW<sub>XL</sub>)で分画した画分の活性を測定し、相当する分子量画分から、分子量を計算し、これを、酵素の分子量で割った値を整数化した。その結果、本発明酵素である各種シロイノシトールデヒドロゲナーゼは、80k〜110kダルトンの分子量を示し、未変性状態では2または3量体を形成していると考えられた。

[0265] 本発明酵素の補酵素の選択性は、反応液(200mMトリス緩衝液pH8.0、2%NADPHまたはNADH、1%シロイノソース)5 $\mu$ lと、酵素液5 $\mu$ lを混合し、36°C、30min反応後、ただちに、500 $\mu$ lの水を加えて、340nmの吸光度を測定し、酵素液の代わりに水を用いた試験液のブランク値から、340nmの吸光度の減少量を測定した。必要があれば、酵素液は希釈を行なった。その結果、本発明酵素である各種シロイノシトールデヒドロゲナーゼは、NADPH、NADHの何れも補酵素として使用できるが、表5に示すような補酵素相対活性を示した。NADPHに対して良く作用する酵素が多いことが判った。

[0266] 本発明酵素の至適pHは、反応液(200mMリン酸緩衝液pH5.0〜9.0、2% NADPH、

1%シロイノソース)5  $\mu$ lと、酵素液5  $\mu$ lを混合し、36℃、30min反応後、ただちに、500  $\mu$ lの水を加えて、340nmの吸光度を測定し、酵素液の代わりに水を用いた試験液のブランク値から、340nmの吸光度の減少量を測定した。必要があれば、酵素液は希釈を行なった。その結果、本発明酵素である各種シロイノシトールデヒドロゲナーゼは、表5に示すような至適pHを示した。つまり、本発明酵素はpH5〜9の広い範囲で作用することが判った。また、最大活性が酸性側のpH6付近の酵素と、中性域pH6.5〜7.5付近の酵素と、アルカリ性側のpH7.5〜9付近にある酵素があることもわかった。

[0267] 本発明酵素の熱安定性は、酵素液を所定の温度で10min間処理した後、冷却し、この酵素液と反応液(200mMリン酸緩衝液pH5.0〜9.0、2% NADPH、1%シロイノソース)5  $\mu$ lを混合し、36℃、30min反応後、ただちに、500  $\mu$ lの水を加えて、340nmの吸光度を測定し、酵素液の代わりに水を用いた試験液のブランク値から、340nmの吸光度の減少量を測定した。必要があれば、酵素液は希釈を行なった。20℃、10min処理区の活性を100%として相対活性を比較した。その結果、本発明酵素である各種シロイノシトールデヒドロゲナーゼの熱安定性は、表5に示すように各酵素によって異なり、酵素によりその安定性は40〜60℃まで異なることが判った。

[0268] 本発明酵素の重金属効果は、反応液(200mMトリス緩衝液pH8.0、2% NADPH、1%シロイノソース、2mM金属塩)5  $\mu$ lと、酵素液5  $\mu$ lを混合し、36℃、30min反応後、ただちに、500  $\mu$ lの水を加えて、340nmの吸光度を測定し、酵素液の代わりに水を用いた試験液のブランク値から、340nmの吸光度の減少量を測定した。必要があれば、酵素液は希釈を行なった。金属塩の種類は、 $\text{CaCl}_2$ 、 $\text{CoCl}_2$ 、 $\text{ZnSO}_4$ 、 $\text{MgSO}_4$ 、 $\text{SnCl}_2$ 、 $\text{NiCl}_2$ 、 $\text{MnSO}_4$ を使用し、無添加区の活性を100%として相対活性を比較した。その結果、本発明酵素である各種シロイノシトールデヒドロゲナーゼは表5に示すように、少なくとも、 $\text{Co}^{2+}$ イオンの存在下で活性化され、 $\text{Sn}^{2+}$ イオンの存在下で阻害された。ほとんどの酵素は $\text{Zn}^{2+}$ イオンの存在下で阻害されるが、バチルス ズブチリス168株由来の酵素は逆に、 $\text{Zn}^{2+}$ イオンの存在下で活性化された。

[0269] 本発明酵素のシロイノソースに対するKm値は、反応液(200mMトリス緩衝液pH8.0、2% NADPH、0.001〜2.5%シロイノソース)5  $\mu$ lと、酵素液5  $\mu$ lを混合し、36℃30min反応後、ただちに、500  $\mu$ lの水を加えて、340nmの吸光度を測定し、酵素液の代わり

に水を用いた試験液のブランク値から、340nmの吸光度の減少量を測定した。必要があれば、酵素液は希釈を行なった。値は逆数プロットされ、 $K_m$ 値を算出した。その結果、本発明酵素である各種シロ-イノシトールデヒドロゲナーゼの $K_m$ 値は表5に示すように、2.6ー12.6mMの範囲を示した。

[0270] 本発明酵素の基質特異性は、酸化活性を指標にシロ-イノシトールに対する反応性に対する相対活性を測定した。使用したイノシトール異性体は、シロ-イノシトール(SI)、ミオ-イノシトール(MI)、D-キロ-イノシトール(DCI)、L-キロ-イノシトール(LCI)、エピー-イノシトール(EI)、ムコ-イノシトール(MuI)、アロ-イノシトール(AI)、ネオ-イノシトール(NI)である。表5には相対活性が70%以上の区、70%未満20%以上の区、20%未満の区で表示した。

[0271] 基質特異性の測定方法は、反応液(各種イノシトール異性体1%(ネオ-イノシトールのみ0.4%)、200mMトリス緩衝液pH8.0、0.002% $NADP^+$ 、0.002%ジアホラーゼ、0.01%ニトロテトラゾリウムブルー)50  $\mu$  lと、酵素液50  $\mu$  lを混合し、25°C、3min毎に、545nmの吸光度の増加をマイクロプレートリーダーで測定した。時間毎の吸光度の増分から反応速度を算出した結果、酵素の種類別に基質特異性は若干異なり、イノシトール異性体構造との相関から、少なくとも、これらの酵素がシロ-イノシトールデヒドロゲナーゼ活性と、ミオ-イノシトール5-デヒドロゲナーゼ活性を有していることも判明した。

[0272] [表5]

した。

88

[0272] [表5]

表5 各種シロ-イノシトールデヒドロゲナーゼの諸性質一覧

菌株	E. coli	Acetobacter sp.	Bacillus sub.
strain	K12	AB10281 (FERM P-18868)	168株
遺伝子名または酵素名	ydgJ遺伝子	SIDH2	BC14057遺伝子
分子量 kDalton	38.2k	42k (SDS <sup>+</sup> - <sup>+</sup> )	40.1k
会合特性	2量体	2量体	2量体
熱安定性	45℃まで安定	60℃まで安定	40℃まで安定
補酵素相対活性	NADPH : NADH=100 : 9	NADPH : NADH=100 : 1	NADPH : NADH=100 : 52
至適 pH	pH7.5~9.0	pH5.5~6.5	pH7.0~8.5
重金属効果 : 活性化	Co	Co	Co, Mn, Zn
重金属効果 : 強阻害	Sn, Zn	Sn, Zn	Sn
還元反応生産物	SIS→SIのみ	SIS→SIのみ	SIS→SIのみ
シロ-イノールに対するKm値	3.9mM	10.6mM	12.6mM
基質特異性 相対活性 (70%以上)	SI, MI, DCI	SI	SI, MI
基質特異性 相対活性 (20~70%)	LCI, EI, MuI	MI	DCI, EI, AI, NI
基質特異性 相対活性 (20%未満)	AI, NI	DCI, LCI, EI, MuI, AI, NI	LCI, MuI

菌株	Agrobacterium tumefaciens	Agrobacterium sp.	Xanthomonas campestris
strain	C58	AB10121 (FERM P-17383)	pv. campestris
遺伝子名または酵素名	Atu4375遺伝子	Atu4375遺伝子	Xcc3438遺伝子
分子量 kDalton	41.3k	41.4k	38.5k
会合特性	2量体	2量体	2量体
熱安定性	50℃まで安定	50℃まで安定	40℃まで安定
補酵素相対活性	NADPH : NADH=100 : 9	NADPH : NADH=100 : 6	NADPH : NADH=100 : 34
至適 pH	pH6.5~8.5	pH7.0~8.5	pH6.5~7.5
重金属効果 : 活性化	Co, Mn	Co, Mn, Ca	Co
重金属効果 : 強阻害	Sn, Zn	Sn, Zn	Sn, Zn
還元反応生産物	SIS→SIのみ	SIS→SIのみ	SIS→SIのみ
シロ-イノールに対するKm値	9.2mM	9.8mM	9.1mM
基質特異性 相対活性 (70%以上)	SI, MI, DCI, EI	SI, MI, DCI, EI	SI, DCI
基質特異性 相対活性 (20~70%)	LCI, MuI	LCI, MuI	MI
基質特異性 相対活性 (20%未満)	AI, NI	AI, NI	EI, LCI, MuI, AI, NI

略号 SIS : シロ-イノール, SI : シロ-イノール, MI : シロ-イノール, DCI : D-キロ-イノール, LCI : L-キロ-イノール, EI : エド-イノール, MuI : ユー-イノール

AI : アロ-イノール, NI : ニロ-イノール

[0273] [表6-1]

表6:各種シロイノシトールデヒドロゲナーゼのアミノ酸配列相同性

E. coli. ydgJ (配列番号 2)	-----MSDNIRVGLIGYGYASKTFHAPLI-----AGTPGQELAVIS--SSDETKV
X. camp. Xcc3438	-----MPKPFNLAVVGYGYVGRTFHAPLI-----ASTPGLQLHSVV--SSKPOQP (配列番号 1 4)
B. sub. BG14057	-MITLLKGRRKVDTIKVGILGYGLSGSVFHGPLL-----DVLDEYQISKIM--TSRTEEV (配列番号 8)
A. tume. Atu4375	---MSSATKKFDSRRIRLGMVGGGGGAFIGAVHRI-----AARLDDRYELVAGALSSDPARA (配列番号 4)
AB10121Atu4375	---MSSAPKKFDSRRIRLGMVGGGGGAFIGAVHRI-----AARLDDRYELVAGALSSDPARA (配列番号 1 0)
A. tume. Atu3234	MAIEGKTTDVANKRIRLGMVGGGGGAFIGGVHRM-----AARLDNRFDLVAGALSSTPEKS (配列番号 6)
AB10121Atu3234	MAIEGKTTDKANKRIRLGMVGGGGGAFIGGVHRM-----AARLDNRFDLVAGALSSTPEKS (配列番号 1 2)
AB10281SIDH1	-----MTKRKLRLIGLIGSG--FMGRTHAFGYSTASRVFDLPFQPELTCLADISDE (配列番号 2 8)

: : : : \* \*

E. coli. ydgJ	KADWPTVTVVSE-----PKHLFNDPNIDLIVITPNDTHFPLAKAALEAGKHVVV
X. camp. Xcc3438	QADFREVRLPD-----LEAALADPALDAVVIATPNOTHAPMALQALAAAGKHLV
B. sub. BG14057	KRDFPDAAEVVHE-----LEEITNDPAIELVIVTTPSGLHYEHTMACIQAGKHVVM
A. tume. Atu4375	AASATLLGIAPERSYASFEDMAATEAGREDGIEAVIVTPNHLHFAPSKAFLEAGIHVIC
AB10121Atu4375	AASATLLGIAPERSYASFEEAAAAGRDDGIEAVIVTPNHLHFAPSKAFLEAGIHVIC
A. tume. Atu3234	LASGRELGLDSERCYGSFEEMAEKEALREDGIEAVIVTPNHVHYPAAKAFLEAGIHVIC
AB10121Atu3234	LASGRELGLDPERCYGSFEEMAEKEALREDGIEAVIVTPNHVHYPAAKAFLEAGIHVIC
AB10281SIDH1	AAAKAADALGFARSTDWRTL-----NDPEIDVVNITAPNAFKEMALAAIAGKHVYC

: : : : : \* \* : : : \* \*\*:

E. coli. ydgJ	DKPFTVTLSQARELDALAKSLGRVLSVFHRRWDSDFLTGLLAEGVLGEVAYFESHFD
X. camp. Xcc3438	DKPFALDAAQARTVVDAAAEAGKIVSVFQRRWDADFLTVRRLIEDGQLGEVVEFHSFD
B. sub. BG14057	EKPMTATAEEGETLKRAADEKGVLLSVYHRRWDDNDFLTIKKLISEGSLEDINTYQVSYN
A. tume. Atu4375	DKPVTATLEEAKALAGIVRASDSLFLVTHNYTGYAMLRQMRMIAEGAIGKLRHVQAEYA
AB10121Atu4375	DKPVTATLEEAKALAEIVRASDSLFLVTHNYTGYAMLRQMRQMVADGAIGKLRHVQAEYA
A. tume. Atu3234	DKPLTSNLEDAKKLDVADKADALFILTHNYTGYPMVRHARELVEAGALGNIRLVQMEYP
AB10121Atu3234	DKPLTSNLEDAKKLDVADKADALFILTHNYTGYPMVRHARELVESGALGTIRLVQMEYP
AB10281SIDH1	EKPLAPLAADAREMAEAAEAKGVKTQVGFNYLCNPMLALARDMIAAGELGEIRGYRGLHA

: \*\* : : : : : : : \* : : : \* : : : :

E. coli. ydgJ	RFRP-----QVRDRWREQGGP--GSGIWWQLAPHLLDQAITLFG-LPVSM--TVDL
X. camp. Xcc3438	RYRP-----QVRDRWRESIP--GAGLWYDLGPHLLDQALQLFG-MPOAI--SADL
B. sub. BG14057	RYRP-----EVQARWREKEGT--ATGTLYDLGSHIIDQTLHLFG-MPKAV--TANV
A. tume. Atu4375	QDWLTEAVEKTGAKGAEWRTDPSRSGAGGAIIGTIGTAFNAAAFVTGEIPSSL--YADL
AB10121Atu4375	QDWLTEAVEKTGAKGAEWRTDPSRSGAGGAIIGTIGTAFNAAAFVTGEIPKSL--YADL
A. tume. Atu3234	QDWLTEAVEQTGAKQAVWRTPAQSGVGGSTGIGTIGTAYNLGCFISGLEADEL--AADV
AB10121Atu3234	QDWLAEPTEGTGAKQAVWRTPAQSGAGGSTGIGTIGTAYNLGCFISGLEVDEL--AADV
AB10281SIDH1	EDYMADA-----SSPFTFRLDPA--GGGALADIGSHALATAEFLMGPAAGAITQVMGDC

: : : \* \* : : \* : : : :

[表6-2]

E. coli. ydgJ	AQLRPGA-----QSTDYFHA ILSYPQR-----RVILHGTM LAAAESARYIVH
X. camp. Xcc3438	QRQRTQA-----RSDDYFNVVLRYPRL-----RVILHAGSLVADGSLRFAVH
B. sub. BG14057	MAQRENA-----ETVDYFHLTLDYGKL-----QAILYGGSI VPANGPRYQIH
A. tume. Atu4375	TSFVPGR-----QLDDSAN ILLRYDSG-----AKGMLWASQI AVGNENALSLRVY
AB10121Atu4375	TSFVPGR-----QLDDSAN ILLRYESG-----AKGMLWASQI AVGNENALSLRVY
A. tume. Atu3234	HTFVEGR-----RLDDNAHVMMRFKPKGGKOPARGMLWCSQVAVGHENGLKIRLY
AB10121Atu3234	HTFVEGR-----RLDDNAHVMLRFKPKGGKOPAKGLLWCSQVAVGHENGLKVRVY
AB10281SIDH1	VTVIKTRPDGKGGRTRAVEVDDIGRALLRFENG-----ATGSVEGNW IATGRTMQHDFEVY

. \* : : : : . : :

E. coli. ydgJ	GSRGSYVKYGLDPOEERL—KNGERLP—QEDWGYDMRD—GVLTRVEGEERVEETL
X. camp. Xcc3438	GTRGSYLKHGADTQEDQL—RAGRPPG—TAGWGMPLP—GTLTRVDDGCRVHTHQ
B. sub. BG14057	GKSSFIKYGIDGQEDAL—RAGRKPE—DDSWGADVPEFYGKLTTIRGSDKKTETI
A. tume. Atu4375	GDKGGLEWHHRVPDELWF—TPYGEPKRL I TRNGAGAGAAANRVS RPSGHPEGYLEGFA
AB10121Atu4375	GEKGGLEWHHRVPDELWF—TPYGEPKRL I TRNGAGAGAAANRVS RPSGHPEGYLEGFA
A. tume. Atu3234	GDKAGLEWTQADPNYLWF—TKLGEPKQL I TRGGAGAGAAAARVTR I PSGHPEGYLEAFA
AB10121Atu3234	GDKAGIEWTQADPNYLWF—TKLGELKQL I TRGGAGAGAAAARVTR I PSGHPEGYLEAFA
AB10281SIDH1	GTKGALAF TQGRFNE LHFFSSTDARGRKGFRR I EAGPEHAPYGLFCVAPGHQLGFND—

\*. . . . . : . . .

E. coli. ydgJ	LT-VPGNYPAYYAAIRDALNGDGENPV-PASQAIQVMEL IELGIESAKHRATLCLA—
X. camp. Xcc3438	PDGVPGDYRHCYAAFRDAMAGTAPPPV-SAADAVRLMELLELAQRGAALGQVLWLEGNSS
B. sub. BG14057	PS-VNGSYLTYRKIAESIREGAALPV-TAEEGINVIRI IEAAMESSEKERTIMLEH—
A. tume. Atu4375	TI-YREAADA IIAKREGETAAGEVIYP-GMEDGLAGLAFIDA AVRSSQ-TSTWVGIDI—
AB10121Atu4375	TI-YREAADA IIAKREGKAAAGEVIYP-GMEDGLAGLAFIDA AVRSSQ-TSTWINIDI—
A. tume. Atu3234	TI-YTEAAHA IEARRTGSALDKAVIYP-TVDDGVKGVAFTAC IESGKKNGGVVKL—
AB10121Atu3234	TI-YTEAAHA IEARRTGSVLDKAVIYP-TVDDGVKGVAFTAC IESGKKNGGVVKL—
AB10281SIDH1	———LKAIEVARYLEALAGHHPEPFNFRAGLR I QTLVETIHASS-KSAAWRDVPTDK

. : : . : : . : : : : : :

E. coli. ydgJ	_____
X. camp. Xcc3438	D_____
B. sub. BG14057	_____
A. tume. Atu4375	_____
AB10121Atu4375	_____
A. tume. Atu3234	_____
AB10121Atu3234	_____
AB10281SIDH1	LQAKSRQHEKA

## 実施例 15

[0274] <本発明酵素を用いたシローイノシトールの製造>

本製造法で使用する酵素は、ミオ-イノシトール2-デヒドロゲナーゼと、本発明酵素の2種類が必要である。ここでは、バチルス ズブチリス168株 ATCC23857由来のBG10669遺伝子産物であるミオ-イノシトール2-デヒドロゲナーゼのリコンビナント酵素と、本発明DNAによりコードされる(大腸菌K12株由来ydgJ遺伝子:配列番号1)本発明酵素のリコンビナント酵素を用いた実施例を示す。

- [0275] 始めに、バチルス ズブチリス168株 ATCC23857由来のBG10669遺伝子産物であるミオ-イノシトール2-デヒドロゲナーゼのリコンビナント酵素を得るために以下の実験を行なった。バチルス ズブチリス168株由来のBG10669遺伝子のクローニング、かつ、リコンビナント酵素として発現させるために、以下の配列を有するプライマーを用いて、PCR反応を行った。

配列番号25:BG10669-F 5'- ttgggatccgatgagtttacgtattggcgtaattg -3'

配列番号26:BG10669-R 5'- aaactgcagttagtttgaactgttgtaaaagattgata -3'

- [0276] PCR反応は宝酒造社のEx taq反応用液を使用し、組成はTakara ExTaq Buffer×10倍液 5 $\mu$ l、dNTP mixture 4 $\mu$ l、鋳型DNA 30ng、10 $\mu$ M プライマー溶液 各1 $\mu$ l、Takara ExTaq 0.5 $\mu$ lを50 $\mu$ lになるように水を加え、30 $\mu$ lのミネラルオイルを重層し、調製した。反応条件は、PCR増幅装置(ASTEC社 PC-700)を用い、変成を94℃30秒、アニーリングを53℃1分、伸長を72℃1分、の3段階の反応を35回繰返し行った。上記のPCR反応によって、約1.0 kbpの大きさのDNA断片が増幅した。反応後、重層したミネラルオイルを0.3mlのヘキサンで抽出し、ヘキサン層を除去する操作を3回繰返し、1分間減圧することで、ミネラルオイルを除去した。この様にして得られた反応液50 $\mu$ lからジーンクリーン(Bio101社)を用いてPCR断片を精製した。すなわち、キット添付のNaI溶液を300 $\mu$ l加えて混合し、10 $\mu$ lガラスビーズ溶液を加えて混合し、4℃、15分静置した後に、遠心分離し、DNA断片の吸着したガラスビーズを沈殿させ、上清を除去した。さらに、キット添付のNew wash溶液500 $\mu$ lを加えて、ガラスビーズを懸濁させ、遠心分離し、上清を除去した。このNew wash溶液による洗浄操作は3回繰返しした。次に、ガラスビーズを減圧下で乾燥させ、乾燥後、15 $\mu$ lの滅菌水を加えて、懸濁し、55℃で、15分加温した後、遠心分離を行い、DNA断片を含む上清12 $\mu$ lを得た。

- [0277] 精製されたDNA断片を発現ベクターに組み込む操作は以下の用に行った。すなわち、DNA断片溶液10  $\mu$  lに、発現用プラスミド(pUC118:宝酒造社製)を0.5  $\mu$  g、宝酒造社の制限酵素BamHI、PstIを各1  $\mu$  l、宝酒造社の制限酵素用緩衝液K buffer $\times$ 10倍液 2  $\mu$  lを加え、20  $\mu$  lになるように滅菌水を加え、混合した。この反応液を36 $^{\circ}$ C、2時間反応した。制限酵素反応後、ジーンクリーンを用いて、DNA断片と発現ベクターを単離し、これらをライゲーションさせた。すなわち、制限酵素反応液20  $\mu$  lにキット添付のNaI溶液を300  $\mu$  l加えて混合し、10  $\mu$  lガラスビーズ溶液を加えて混合し、4 $^{\circ}$ C、15分静置した後に、遠心分離し、DNA断片と発現ベクターの吸着したガラスビーズを沈殿させ、上清を除去した。さらに、キット添付のNew wash溶液500  $\mu$  lを加えて、ガラスビーズを懸濁させ、遠心分離し、上清を除去した。このNew wash溶液による洗浄操作は3回繰り返した。次に、ガラスビーズを減圧下で乾燥させ、乾燥後、15  $\mu$  lの滅菌水を加えて、懸濁し、55 $^{\circ}$ Cで、15分加温した後、遠心分離を行い、DNA断片と発現ベクターを含む上清12  $\mu$  lを得た。この操作により、制限酵素によって生じた約50bp以下の小さなDNA断片は取り除かれ、目的とするDNA断片と、発現ベクターが得られた。
- [0278] このようにして調製した溶液10  $\mu$  lにTakara Ligation kit-I溶液(宝酒造社)を10  $\mu$  l加え、16 $^{\circ}$ C、1時間反応させた。この溶液を、コンピテントセル(宝酒造社:DH5  $\alpha$ )に形質転換させた。すなわち、4 $^{\circ}$ Cで解凍したコンピテントセル溶液60  $\mu$  lにライゲーション反応溶液を5  $\mu$  l加え、混合し、0 $^{\circ}$ C30分後、42 $^{\circ}$ C45秒、0 $^{\circ}$ C2分の処理を行い、これに500  $\mu$  l SOC溶液(2%バクトトリプトン、0.5%酵母エキス、10mM NaCl、20mM グルコース、10mM MgSO<sub>4</sub>、10mM MgCl<sub>2</sub>)を加えて、36 $^{\circ}$ Cで1時間回復培養させ、この培養液100  $\mu$  lを、50  $\mu$  g/mlアンピシリン、40  $\mu$  g/ml X-gal(5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- $\beta$ -D-Galactoside)、1mM IPTG(チオガラクトピラノシド)を含むLB寒天培地(1%バクトトリプトン、0.5%酵母エキス、1%NaCl、pH7.0、1.5%寒天)に塗布した。さらに37 $^{\circ}$ C、16時間培養した。この培養により白色に発色したコロニーとして前記のプラスミドの導入で形質転換された大腸菌が得られるため、これを選択した。こうして分離した形質転換大腸菌コロニーをアンピシリン(50  $\mu$  g/ml)を含むLB液体培地で培養した。増殖した形質転換大腸菌の菌体からプラスミド精製キ



ット(QIA filter Plasmid Midi Kit, QIAGEN社)によりプラスミドDNAの分離および精製を行った。こうして得られたプラスミドDNAは、目的とするBG10669遺伝子に相当する約1.0kbpのDNA断片を有することが確認された。

[0279] 次に、ミオーイノシトール2-デヒドロゲナーゼ活性を確認するため、コロニーとして単離した菌株を50  $\mu$ g/mlアンピシリンを含む100ml LB培地(1%バクトトリプトン、0.5%酵母エキス、1%NaCl、pH7.0)30本に移植し、36℃7時間培養し、この培養液100ml毎に200mMチオガラクトピラノシド溶液を0.3ml加え、さらに36℃3時間培養した。培養終了後、遠心分離により、菌体を集め、これを生理食塩水で1回洗浄した。さらに、洗浄菌体を0.6%トライトンX100溶液3mlに懸濁し4℃で超音波により菌を破碎した。この溶液を遠心分離し、上清の酵素溶液84mlを取り出し、上清に36g硫酸を加え、4℃でタンパク質を塩析させた。塩析したタンパク質を遠心分離で集め、上清を除去し、この沈殿物を75mlの20mMトリス緩衝液 pH7.0に溶解させ、再度遠心分離を行い、上清を20mMトリス緩衝液 pH7.0で平衡化したShephadex G-25カラム(ファルマシア製)(400ml)にアプライし、20mMトリス緩衝液 pH7.0で溶出させ、脱塩を行なった。この操作により、BG10669遺伝子産物であるの粗酵素液105mlを得た。

[0280] ミオーイノシトール2-デヒドロゲナーゼ還元活性は以下のように測定した。反応液(200mM トリス緩衝液pH8.0、2% NADH、1%シローイノソース)5  $\mu$ lと、酵素液5  $\mu$ lを混合し、36℃で30min反応後ただちに、500  $\mu$ lの水を加えて、340nmの吸光度を測定し、酵素液の代わりに水を用いた試験管のブランク値から、340nmの吸光度の減少量を測定した。必要があれば酵素液は希釈を行い、シローイノソースの還元活性があることを確認した。一方、酸化活性の測定方法は、反応液(ミオーイノシトールまたはシローイノシトール1%、200mMトリス緩衝液pH8.0、0.002% NAD<sup>+</sup>、0.002%ジアホラーゼ、0.01%ニトロテトラゾリウムブルー)50  $\mu$ lと、酵素液50  $\mu$ lを混合し、25℃、3min毎に、545nmの吸光度の増加をマイクロプレートリーダーで測定した。時間毎の吸光度の増分から反応速度を算出し、調製された酵素の酸化活性がミオーイノシトールに活性を示し、シローイノシトールに活性を示さないことを確認した。

[0281] このようにして調製されたミオーイノシトール2-デヒドロゲナーゼ酵素溶液と、実施例11で調整されたシローイノシトールデヒドロゲナーゼ粗酵素溶液(30倍スケールである

3L培養液から調製した酵素液105ml)を用いて、ミオーイノシトールからシローイノシトールへの変換反応を行なった。反応溶液は、ミオーイノシトール200g、5%シローイノソース70ml、 $\text{CoCl}_2$  130mg、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  250mgと、水を加えて750mlにし、50℃まで加熱して、ミオーイノシトールを溶解させる。これを36℃まで冷却し、1N NaOH水溶液でpH8.0に調製し、水を加えて790mlにする。これに36℃で、ミオーイノシトール2-デヒドロゲナーゼの粗酵素液105ml、シローイノシトールデヒドロゲナーゼ粗酵素溶液105ml、 $\text{NADP}^+$  70mgを加えて、約1Lになる溶液を、36℃で保温し、ゆっくり攪拌しながら、反応させる。反応液はpHが徐々に酸性になるため、1N NaOHでpH8.0になるように調製する。42時間後、反応液中にシローイノシトールの結晶が生じ、白濁した反応液が得られる。この溶液をろ紙を用いて、ろ過し、結晶性シローイノシトール(湿重量73g)を回収した。この固体に3Lの水を加えて、50℃で溶解させ、4.5Lになるように水を加えて、室温まで冷却し、得られた溶液を遠心分離(8,000 rpm 20分間)して、微量な不溶物を除去した上清液を、強塩基性陽イオン交換樹脂100mlカラム、強酸性陰イオン交換樹脂100mlカラム、活性炭50mlカラムの順に通過させて溶出させた溶出液を得た後に、カラム洗浄のために500mlの水を順に通過させ溶出させた洗浄液と、溶出液を一緒にして、濃縮した。

- [0282] 濃縮は、溶液の量が少なくなると、シローイノシトールの微結晶が析出し始め、内容物が130gになるまで濃縮し、これを4℃まで冷却後、一晚放置した。放置後、スラリー状になった物質をろ過し、ろ紙上のシローイノシトールの結晶を少量の水で洗浄後、105℃で3hr乾燥させた。得られたシローイノシトールは白色の結晶(61g)で、NMR分析、および、HPLC分析では、他に不純物は認められず、純度99%以上のものであった。ミオーイノシトールからの収率は31%であった。また、ろ別された反応液は、まだ、使用可能であり、ミオーイノシトールを64g溶解させると、さらに、結晶性シローイノシトールが析出した。

## 実施例 16

- [0283] <シローイノシトール・ホウ酸複合体の形成、および形成条件の検討>

粉末のシローイノソース100gを500mlの熱水に溶解し、室温まで冷却後、水を加えて900mlになるようにした。この溶液を5規定NaOH水溶液を用いて、pH7.5に合

わせ、さらに水を加えて、1リットルになるようにした。

[0284] この溶液に、攪拌しながら、 $\text{NaBH}_4$  5.9gを粉末で徐々に15分かけて加え、還元反応を行なった。反応溶液は反応熱により38℃まで温度が上昇した。30分後、32℃まで冷却された反応液に、ホウ酸 67.5gとNaCl 72.2gを溶解させ、複合体形成溶液を調製した。この溶液のpHは5.9であった。

[0285] 次に、8規定NaOH水溶液を用いて、pH6.0に調整した複合体形成溶液を200ml容の蓋付きのプラスチック容器に100ml取り分け、さらに、8規定NaOH水溶液を用いてpH7.0に調整した複合体形成溶液を同様の操作で100ml取り分け、さらに、pH 8.0、9.0、9.5、10.0、10.5、11.0、12.0および12.8になるように調整した複合体形成溶液も、順次、100ml取り分けた。

[0286] このようにpH調整された溶液は、徐々に沈殿を形成し始めた。1日おきに沈殿をろ別し、ろ液は8規定NaOH水溶液を用いて、pHを所定のpHに調整した後にもとの容器に戻し、得られた沈殿は乾燥後、重量を測定した。本来、還元によって生成するシロイノシールが全てシロイノシール・ホウ酸複合体になり、かつ、全てが沈殿として得られた場合、沈殿の重量は61.8gになるため、各pH調整された溶液から得られた沈殿の重量を1日おきに積算し、これを理論収量の61.8gで割った値を、シロイノシール・ホウ酸複合体沈殿の回収率とした。

[0287] このようにして得られた数値を、表にまとめると以下の様になった。

表中の灰色部分は、回収率が90%を超えた試験区を示す。

[0288] [表7]

表7

処理pH	シロイノシールホウ酸複合体沈殿の回収率						
	1日目	2日目	3日目	4日目	5日目	6日目	7日目
6	9.4%	17.9%	25.5%	32.4%	38.6%	44.2%	49.2%
7	21.7%	38.4%	51.2%	61.1%	68.7%	74.6%	79.1%
8	42.4%	65.7%	78.6%	85.6%	89.5%	91.6%	92.8%
9	66.9%	86.3%	91.9%	93.6%	94.0%	94.2%	94.2%
9.5	82.9%	92.9%	94.1%	94.2%	94.2%	94.2%	94.2%
10	57.5%	79.9%	88.6%	92.1%	93.4%	93.9%	94.1%
10.5	41.5%	64.7%	77.7%	85.0%	89.0%	91.3%	92.6%
11	36.8%	59.2%	72.8%	81.2%	86.3%	89.4%	91.3%
12	29.2%	49.4%	63.3%	72.9%	79.5%	84.1%	87.2%
12.8	25.4%	44.0%	57.6%	67.5%	74.7%	80.0%	83.8%

[0289] 表7に示されるように、処理pH9.5の試験区が最もシロイノシトール・ホウ酸複合体沈殿形成に適していることが判る。また、pH9.0、pH9.5、pH10.0の試験区は4日目までに90%以上の回収率を示し、回収率は延長しても94%で一定になることが判る。

[0290] pH9.5の試験区の7日目のろ液のNMR分析から、溶液中には、5.9% (w/v) のミオイノシトールと、約0.2% (w/v) のシロイノシトールが残留していることが判明した。つまり、0.2% (w/v) 以上の濃度のシロイノシトール・ホウ酸複合体は、本方法によって沈殿として取り出すことができることが判る。

### 実施例 17

[0291] <シロイノソース還元混合液からシロイノシトール・ホウ酸複合体を形成させ、複合体を溶解した後、イオン交換樹脂を用いてシロイノシトールを遊離、脱塩する方法>

粉末のシロイノソース10g (56mmol) を50mlの熱水に溶解し、室温まで冷却後、水を加えて90mlになるようにした。この溶液を5規定NaOH水溶液を用いて、pH7.5に合わせ、さらに水を加えて、100mlになるようにした。

[0292] この溶液に、攪拌しながら、 $\text{NaBH}_4$  0.59gを粉末で徐々に15分かけて加え、還元反応を行なった。反応溶液は反応熱により36℃まで温度が上昇した。30分後、31℃まで冷却された反応液に、ホウ酸 6.75gとNaCl 7.22gを溶解させ、複合体形成溶液を調製した。次に、この複合体形成溶液を5規定NaOH水溶液を用いて、pH9.5に調整し、攪拌しながら、pHスタット装置を取りつけ、5規定NaOH水溶液を用いて、pH9.5を維持する様にした。3日後に複合体形成溶液中に析出した沈殿をろ過し、少量の水で洗浄し、乾燥後、5.71g (20.5mmol) のシロイノシトール・ホウ酸複合体を得た。

[0293] 得られたシロイノシトール・ホウ酸複合体5.71gに1.05規定の塩酸溶液を230ml加え、シロイノシトール・ホウ酸複合体を溶解し、溶解液を得た。この溶解液は、0.2規定の酸性溶液であった。次に、カラムに詰めた強酸性イオン交換樹脂 (DuoliteC20、 $\text{H}^+$ タイプ、住友化学) 200mlに溶解液を1分間に2mlの流速で通過させ、得られた溶出液を、カラムに詰めた強塩基性イオン交換樹脂 (DuoliteA116、 $\text{OH}^-$ タイプ、住友化学) 400mlに通過させた。得られた溶出液を濃縮し、白色粉末3.52g (19.5mmol) を得

た。この白色粉末は、NMRによる分析で、シロ-イノシトールであることが判った。また、シロ-イノソースからの収率は35%であった。

### 実施例 18

- [0294] <シロ-イノソース還元混合液からシロ-イノシトール・ホウ酸複合体を形成させ、複合体を溶解した後、有機溶媒沈殿を用いてシロ-イノシトールを遊離、結晶化する方法>

粉末のシロ-イノソース10g (56mmol) から、実施例17に示す方法と同様の方法で調製した5.71g (20.5mmol) のシロ-イノシトール・ホウ酸複合体を原料とした。

- [0295] シロ-イノシトール・ホウ酸複合体5.71gを100ml容の蓋付き三角フラスコに攪拌子と一緒に入れ、22.8mlの1.83規定の塩酸溶液を加えて、懸濁溶液を調製した。攪拌1時間後、メタノールを23ml加えて、さらに攪拌した。5時間後、懸濁溶液を、ろ過し、固体を少量のメタノールで洗浄し、乾燥させ、粗シロ-イノシトール3.58g (20.0mmol) を得た。

- [0296] さらに、得られた粗シロ-イノシトール3.58gを230mlの水に溶解し、強酸性イオン交換樹脂 (DuoliteC20・H<sup>+</sup>タイプ) 20ml、強塩基性イオン交換樹脂 (DuoliteA116・OH<sup>-</sup>タイプ) 40mlを加えて攪拌した。攪拌30分後に、イオン交換樹脂をろ別し、得られたろ液を濃縮し、白色粉末3.41g (18.9mmol) を得た。この白色粉末は、NMRによる分析で、シロ-イノシトールであることが判った。また、シロ-イノソースからの収率は34%であった。

### 実施例 19

- [0297] <シロ-イノソースを還元した後、直接、シロ-イノシトールを遊離、結晶化させる方法>

粉末のシロ-イノソース5g (28mmol) を40mlの熱水に溶解し、室温まで冷却後、この溶液を5規定NaOH水溶液を用いて、pH7.5に合わせ、水を加えて45mlになるようにした。

- [0298] この溶液に、攪拌しながら、NaBH<sub>4</sub> 0.29gを粉末で徐々に15分かけて加え、還元反応を行なった。反応溶液は反応熱により37℃まで温度が上昇した。30分後、30℃まで冷却された反応液を、5規定塩酸を用いて、pH1.0に調整した。その後、水を加えて50mlになるようにし、0.1規定の酸性溶液とした。次に、この溶液に、攪拌しながら、

メタノール25mlを加えたところ、溶液は10分後から徐々に濁り始め、さらに、この懸濁溶液を24時間攪拌した。24時間後、懸濁溶液をろ過し、少量のメタノールで洗浄し、乾燥後、1.55g (8.6mmol) の粗シロイノシトールを得た。

- [0299] さらに、得られた粗シロイノシトール1.55gを120mlの水に溶解し、強酸性イオン交換樹脂 (DuoliteC20・H<sup>+</sup>タイプ) 10ml、強塩基性イオン交換樹脂 (DuoliteA116・OH<sup>-</sup>タイプ) 20mlを加えて攪拌した。攪拌30分後に、イオン交換樹脂をろ別し、得られたろ液を濃縮し、白色粉末1.51g (8.3mmol)を得た。この白色粉末は、NMRによる分析で、シロイノシトールであることが判った。また、シロイノソースからの収率は30%であった。

#### 産業上の利用の可能性

- [0300] 本発明によれば、医薬品として利用価値があるシロイノシトールを、安価なミオイノシトールから、微生物変換または酵素反応のみで、直接に製造することができ、シロイノシトールを効率良く製造することができる。また、本発明の製造方法は、異性体が生じにくいという利点もある。

本発明のNAD<sup>+</sup>非依存型ミオイノシトール2-デヒドロゲナーゼを用いることにより、NAD<sup>+</sup>を反応液中に添加することなく、シロイノソースを製造することができる。さらに得られたシロイノソースを還元することにより、簡便かつ高効率で高純度のシロイノシトールを得ることができる。

本発明によれば、シロイノシトール及びシロイノシトール以外の中性糖を含有する混合液から、効率良くシロイノシトール・ホウ酸複合体を形成させることができ、得られたシロイノシトール・ホウ酸複合体から高純度のシロイノシトールを効率よく簡便な操作で得ることができる。

## 請求の範囲

- [1] アセトバクター属またはバークホルデリア属に属する微生物であって、ミオーイノシトールをシローイノシトールに変換する能力を有する微生物を、ミオーイノシトールを含む溶液中でミオーイノシトールに作用させることにより、シローイノシトールを前記溶液中に生成蓄積させ、該溶液中からシローイノシトールを採取することを特徴とする、シローイノシトールの製造方法。
- [2] 前記ミオーイノシトールを含む溶液がミオーイノシトールを含有する液体培地であり、前記微生物を、該液体培地中で培養することによりミオーイノシトールに作用させることを特徴とする、請求項1に記載の製造方法。
- [3] 培養により得られた前記微生物の菌体を、前記溶液中でミオーイノシトールに作用させることを特徴とする、請求項1に記載の製造方法。
- [4] 前記微生物が、アセトバクター・セルビシエ、アセトバクター・マローラム、またはバークホルデリア・アンドロポゴニスに属する微生物である請求項1〜3のいずれかの項に記載の製造方法。
- [5] 前記微生物が、アセトバクター・エスピーAB10281株(FERM BP-10119)またはその変異株である、請求項1〜3のいずれか一項に記載の製造方法。
- [6] ミオーイノシトールをシローイノシトールに変換する能力を有する、アセトバクター・エスピーAB10281株(FERM BP-10119)またはその変異株。
- [7] 少なくとも以下の理化学的性質を有するNAD<sup>+</sup>非依存型ミオーイノシトール2-デヒドロゲナーゼ

(a) 作用: 電子受容物質の存在下で、ミオーイノシトールから電子を奪いシローイノソースを生成する反応を触媒する、

(b) 至適pH: pH4.5〜5.5において活性が極大値を示す、

(c) 補因子: 1モルの酵素に1モルのヘム鉄を含有する、

(d) 阻害剤: 1mMのSn<sup>2+</sup>イオンにより酵素活性が1%以下に阻害される、

(e) サブユニット構造: 少なくとも分子量76kダルトンと46kダルトンのタンパク質を含有するヘテロマーである、

(f) 基質特異性: D-キローイノシトール、ムコイノシトール、ミオーイノシトールに反

応し、D-キロー1-イノソース、L-キロー2-イノソース、シローイノソースへ、それぞれ、変換する。アローイノシトール、シローイノシトール、L-キローイノシトール、グルコースには反応しない。

- [8] NAD<sup>+</sup>非依存型ミオーイノシトール2-デヒドロゲナーゼ生産能を有するアセトバクター属に属する微生物を培養し、培養された微生物の菌体から、NAD<sup>+</sup>非依存型ミオーイノシトール2-デヒドロゲナーゼを分離精製することを特徴とする、NAD<sup>+</sup>非依存型ミオーイノシトール2-デヒドロゲナーゼの製造方法。
- [9] 前記微生物がアセトバクター・エスピーAB10253株 (FERM BP-10136)である、請求項8記載の製造方法。
- [10] ミオーイノシトール及び電子受容体を含む溶液中で、NAD<sup>+</sup>非依存型ミオーイノシトール2-デヒドロゲナーゼをミオーイノシトールに作用させてシローイノソースを生成せしめ、生成したシローイノソースを溶液中から分離精製することを特徴とする、シローイノソースの製造方法。
- [11] ミオーイノシトール及び電子受容体を含む溶液中で、NAD<sup>+</sup>非依存型ミオーイノシトール2-デヒドロゲナーゼをミオーイノシトールに作用させてシローイノソースを生成させる工程、前記シローイノソースに還元剤を作用させてシローイノシトールを生成させる工程、及び前記シローイノシトールを分離精製する工程を含む、シローイノシトールの製造方法。
- [12] アセトバクター・エスピーのAB10253株を変異処理し、得られた変異株から、NAD<sup>+</sup>非依存型ミオーイノシトール2-デヒドロゲナーゼ活性を指標にして選別することを特徴とする、シローイノソース製造用微生物のスクリーニング方法。
- [13] 微生物を含む天然試料の中から微生物を単離し、単離された微生物から、NAD<sup>+</sup>非依存型ミオーイノシトール2-デヒドロゲナーゼ活性を指標にして選別することを特徴とする、シローイノソース製造用微生物のスクリーニング方法。
- [14] 請求項12又は13に記載のスクリーニング方法によって得られたシローイノソース製造用微生物を、ミオーイノシトールを含む培地で培養することにより、ミオーイノシトールからシローイノソースを生成せしめ、生成したシローイノソースを培地から分離精製することを特徴とする、シローイノソースの製造方法。

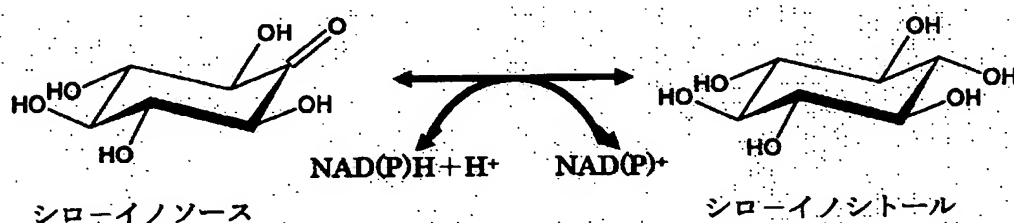


- [15] 請求項12又は13に記載のスクリーニング方法によって得られたシロイノソース製造用微生物を、ミオイノシトールを含有する培地で培養することにより、ミオイノシトールからシロイノソースを生成させる工程、前記シロイノソースに還元剤を作用させてシロイノシトールを生成させる工程、及び前記シロイノシトールを分離精製する工程を含む、シロイノシトールの製造方法。

- [16] 下記の理化学的性質を有するシロイノシトールデヒドロゲナーゼ。

反応: 下記反応式に示すように、シロイノシトールとシロイノソース間の酸化還元反応を触媒し、NADHまたはNADPH存在下で、シロイノソースを立体特異的にシロイノシトールへ還元する。

[化1]



- [17] さらに、下記の理化学的性質を有する、請求項16に記載のシロイノシトールデヒドロゲナーゼ。

(1) 分子量および会合特性 : 38〜46kダルトン、2または3量体を形成する。

(2) 補酵素 :  $\text{NAD}^+$  若しくは  $\text{NADP}^+$  又は  $\text{NADH}$  若しくは  $\text{NADPH}$  を補酵素とする。

(3) 活性化重金属 :  $\text{Co}^{2+}$  イオンの存在下で活性化される。

(4) 阻害重金属 :  $\text{Sn}^{2+}$  イオンの存在下で阻害される。

(5) 至適pH : pH5〜9で活性を有する。

- [18] 以下の(A)または(B)のタンパク質。

(A) 配列番号28に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質。

(B) 配列番号28に記載のアミノ酸配列において、1もしくは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および/または付加したアミノ酸配列を有し、シロイノシトールとシロイノソース間の酸化還元反応を触媒し、NADHまたはNADPH存在下で、シロイノソースを立体特異的にシロイノシトールへ還元する酵素活性を有するタンパク質。

- [19] 以下の(A)または(B)のタンパク質をコードするDNA。  
(A)配列番号28に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質。  
(B)配列番号28に記載のアミノ酸配列において、1もしくは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および／または付加したアミノ酸配列を有し、シロイノシトールとシロイノソース間の酸化還元反応を触媒し、NADHまたはNADPH存在下で、シロイノソースを立体特異的にシロイノシトールへ還元する酵素活性を有するタンパク質。
- [20] 以下の(a)または(b)のDNA。  
(a)配列番号27に記載の塩基配列のコード領域を含むDNA。  
(b)配列番号27に記載の塩基配列もしくは同塩基配列に相補的な塩基配列を有するDNAとストリジェントな条件下でハイブリダイズし、シロイノシトールとシロイノソース間の酸化還元反応を触媒し、NADHまたはNADPH存在下で、シロイノソースを立体特異的にシロイノシトールへ還元する酵素活性を有するタンパク質をコードするDNA。
- [21] 請求項19または20に記載のDNAを含むベクター。
- [22] 請求項19または20に記載のDNA、または請求項21に記載のベクターを保持する形質転換微生物。
- [23] 形質転換する宿主が大腸菌である請求項22に記載の形質転換微生物。
- [24] 請求項22または23に記載の形質転換微生物を培養し、培養物からシロイノシトールデヒドロゲナーゼを採取することを特徴とする、シロイノシトールデヒドロゲナーゼの製造方法。
- [25] 請求項16に記載のシロイノシトールデヒドロゲナーゼと、 $\text{NAD}^+$ または $\text{NADP}^+$ 存在下でミオイノシトールを酸化しシロイノソースを生成する反応を触媒するミオイノシトール2-デヒドロゲナーゼ(EC1.1.1.18)とを共存させた溶液中、pH6.0～8.5で、かつ $\text{NAD}^+$ または $\text{NADP}^+$ 存在下で、ミオイノシトールを基質として、シロイノシトールへ酵素変換反応させることを特徴とする、シロイノシトールの製造方法。
- [26] 溶液中に、シロイノソースを0.01～3%になるように添加することを特徴とする、請求項25に記載のシロイノシトールの製造方法。
- [27] 溶液中に、シロイノソースを0.2～0.5%になるように添加することを特徴とする、請求

項25に記載のシロイノシトールの製造方法。

- [28] 溶液中に、Co塩および／または、Mg塩を0.01〜5.0mMになるように添加することを特徴とする、請求項25に記載のシロイノシトールの製造方法。
- [29] 溶液中に、Co塩および／または、Mg塩を0.2〜2.0mMになるように添加することを特徴とする、請求項25に記載のシロイノシトールの製造方法。
- [30] 溶液中のミオイノシトール濃度が5〜22%になるように調製し、酵素反応で生成したシロイノシトールを反応溶液中で結晶化させ、シロイノシトールを系外に結晶として、ろ別することを特徴とする、請求項25に記載のシロイノシトールの製造方法。
- [31] シロイノシトールデヒドロゲナーゼが以下の(A)または(B)のタンパク質である請求項25に記載の製造方法。
- (A) 配列番号28に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質。
- (B) 配列番号28に記載のアミノ酸配列において、1もしくは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および／または付加したアミノ酸配列を有し、シロイノシトールとシロイノソース間の酸化還元反応を触媒し、NADHまたはNADPH依存下で、シロイノソースを立体特異的にシロイノシトールへ還元する酵素活性を有するタンパク質。
- [32] シロイノシトールデヒドロゲナーゼが以下の(a)または(b)のDNAによってコードされるタンパク質である請求項25に記載の製造方法。
- (a) 配列番号27に記載の塩基配列のコード領域を含むDNA。
- (b) 配列番号27に記載の塩基配列もしくは同塩基配列に相補的な塩基配列を有するDNAとストリジェントな条件下でハイブリダイズし、シロイノシトールとシロイノソース間の酸化還元反応を触媒し、NADHまたはNADPH依存下で、シロイノソースを立体特異的にシロイノシトールへ還元する酵素活性を有するタンパク質をコードするDNA。
- [33] シロイノシトールデヒドロゲナーゼが以下の(C)または(D)のタンパク質である請求項25に記載の製造方法。
- (C) 配列番号2、4、6、8、10、12または14に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質。
- (D) 配列番号2、4、6、8、10、12または14に記載のアミノ酸配列において、1もしくは

は複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および／または付加したアミノ酸配列を有し、シロイノシトールとシロイノソース間の酸化還元反応を触媒し、NADHまたはNADPH存在下で、シロイノソースを立体特異的にシロイノシトールへ還元する酵素活性を有するタンパク質。

- [34] シロイノシトールデヒドロゲナーゼが以下の(c)または(d)のDNAによってコードされるタンパク質である請求項25に記載の製造方法。

(c) 配列番号1、3、5、7、9、11または13に記載の塩基配列のコード領域を含むDNA。

(d) 配列番号1、3、5、7、9、11または13に記載の塩基配列もしくは同塩基配列に相補的な塩基配列を有するDNAとストリジェントな条件下でハイブリダイズし、シロイノシトールとシロイノソース間の酸化還元反応を触媒し、NADHまたはNADPH存在下で、シロイノソースを立体特異的にシロイノシトールへ還元する酵素活性を有するタンパク質をコードするDNA。

- [35] シロイノシトール及びシロイノシトール以外の中性糖を含有する混合液に、該混合液中に溶解したシロイノシトールの2倍モル以上の量のホウ酸及び金属塩を加え、かつ該混合液のpHを8.0～11.0に調整してシロイノシトール・ホウ酸複合体を形成させる第1の工程、前記複合体を混合液から分離する第2の工程、分離した複合体を酸に溶解させてシロイノシトールとホウ酸に開裂させる第3の工程、第3の工程で得られた酸性溶液又は酸性懸濁液からシロイノシトールを単離精製する第4の工程を含む、シロイノシトールの製造方法。

- [36] 前記第1の工程において、加えるホウ酸及び金属塩の量が、前記混合液中に溶解したシロイノシトールの2倍モル以上、かつ3倍モル以下であることを特徴とする、請求項35に記載の製造方法。

- [37] 前記第1の工程において、前記混合液のpHを9.0～10.0に調整することを特徴とする、請求項35に記載の製造方法。

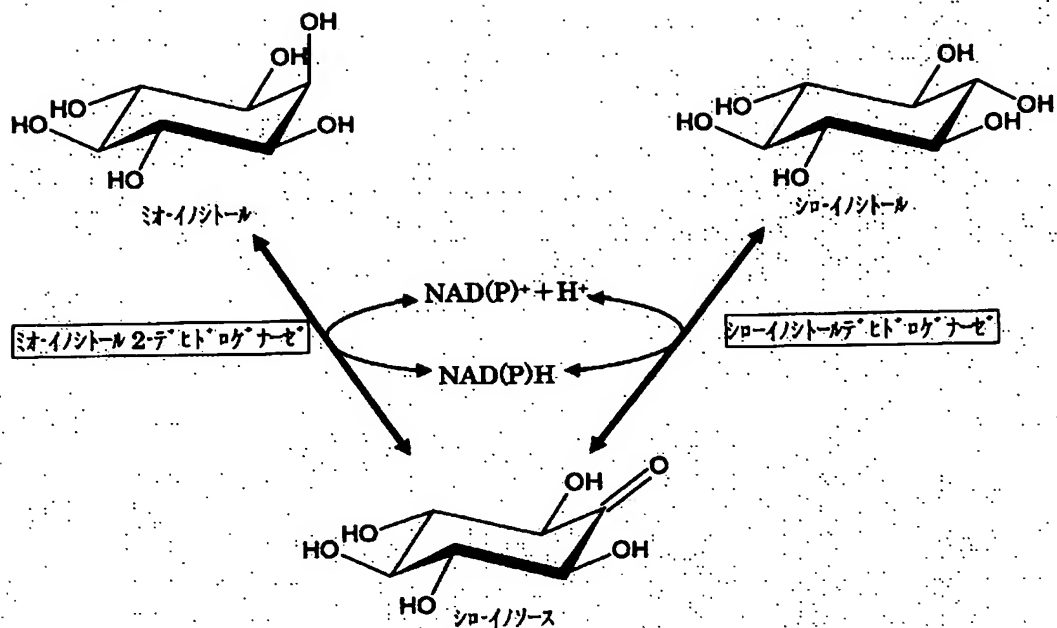
- [38] 前記金属塩が、 $\text{NaCl}$ 、 $\text{NaHCO}_3$ 、 $\text{Na}_2\text{CO}_3$ 、 $\text{Na}_2\text{SO}_4$ 、 $\text{NaHSO}_4$ 、 $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 、 $\text{Na}_3\text{PO}_4$ 、硼砂、 $\text{KCl}$ 、 $\text{KHCO}_3$ 、 $\text{K}_2\text{CO}_3$ 、 $\text{K}_2\text{SO}_4$ 、 $\text{KHSO}_4$ 、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、 $\text{K}_2\text{HPO}_4$ 、 $\text{K}_3\text{PO}_4$ 、 $\text{MgCl}_2$ 、 $\text{MgCO}_3$ 、および $\text{MgSO}_4$ からなる群より選ばれる1種または2種類以上の金属

塩である、請求項35に記載の製造方法。

- [39] 前記シロ-イノシトール及びシロ-イノシトール以外の中性糖を含有する混合液が、シロ-イノソースを含有する溶液中でシロ-イノソースを還元することにより得られるミオ-イノシトール及びシロ-イノシトールを含有する混合液である、請求項35に記載の製造方法。
- [40] 前記第3の工程において、前記複合体を酸に溶解させて得られた溶液を0.1規定以上の酸性に調整し、かつ、前記第4の工程において、前記酸性溶液を強酸性イオン交換樹脂、及び強塩基性イオン交換樹脂又はホウ酸選択的吸着樹脂に接触させた後、該酸性溶液からシロ-イノシトールを析出させることを特徴とする、請求項35に記載の製造方法。
- [41] 前記第4の工程において、前記酸性溶液又は酸性懸濁液に水溶性有機溶媒を加えてシロ-イノシトールを析出させることを特徴とする、請求項35に記載の製造方法。
- [42] 前記水溶性有機溶媒がエタノール又はメタノールであり、前記酸性溶液又は酸性懸濁液に対して、エタノールを0.3〜3倍容、又はメタノールを0.3〜5倍容加えることを特徴とする、請求項41に記載の製造方法。
- [43] 前記水溶性有機溶媒がエタノール又はメタノールであり、前記酸性溶液又は酸性懸濁液に対して、エタノールを0.6〜1.5倍容、またはメタノールを0.9容〜2倍容加えることを特徴とする、請求項41に記載の製造方法。
- [44] シロ-イノソースを含有する溶液中において、シロ-イノソースを水素化ホウ素金属塩を用いて還元し、ミオ-イノシトール及びシロ-イノシトールを含有する混合液を得る第1の工程、前記混合液に酸を加えて混合液中のシロ-イノシトール・ホウ酸複合体を溶解させ、かつ溶液を0.01規定以上の酸性溶液に調整する第2の工程、及び前記酸性溶液に、水溶性有機溶媒をミオ-イノシトールが析出しない量で加えて、シロ-イノシトールのみを析出させる第3の工程を含む、シロ-イノシトールの製造方法。
- [45] 前記第3の工程において、加える水溶性有機溶媒がエタノール、メタノール又は1-プロパノールであり、前記酸性溶液に対して、エタノールを0.2〜0.4倍容、メタノールを0.2〜0.8倍容、又は1-プロパノールを0.2〜0.4倍容加えることを特徴とする、請求項44に記載の製造方法。

- [46] 前記第3の工程において、加える水溶性有機溶媒がエタノール、メタノール又は1-プロパノールであり、前記酸性溶液に対して、エタノールを0.35〜0.45倍容、メタノールを0.45〜0.55倍容、又は1-プロパノールを0.35〜0.45倍容加えることを特徴とする、請求項44に記載の製造方法。

[図1]



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/015174

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> C12P7/18, C12N1/20, C12N9/04, C12P7/26, C12N15/53, C12N1/21,  
C07C35/16// (C12P7/18, C12R1:02)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C12P7/18, C12N1/20, C12N9/04, C12P7/26, C12N15/53, C12N1/21,  
C07C35/16

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

Genbank/EMBL/DDBJ/Swissprot/PIR/Geneseq, WPIDS/BIOSIS/BIOTECHABS/CA (STN)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	Wood D.W. et al., The genome of the natural genetic engineer Agrobacterium tumefaciens C58, Science, 2001, Vol.294, pages 2317 to 2323	19-23 1-18, 24-46
A	JP 2003-102492 A (Hokko Chemical Industry Co., Ltd.), 08 April, 2003 (08.04.03), (Family: none)	1-46
A	JP 9-140388 A (Hokko Chemical Industry Co., Ltd.), 03 June, 1997 (03.06.97), (Family: none)	1-46

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
04 January, 2005 (04.01.05)

Date of mailing of the international search report  
25 January, 2005 (25.01.05)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.



**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2004/015174

**C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 60-248637 A (Merck Patent GmbH.), 09 December, 1985 (09.12.85), & DE 3405663 A	1-46

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2004/015174

**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
  
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

The matter common to claims 1 and 10 to 15 resides in treating "myo-inositol" with NAD<sup>+</sup>-independent myo-inositol 2-dehydrogenase or a microorganism producing the same and thus performing an oxidation reaction. As described in, for example, JP 2003-102492 A, however, it has been known to obtain scyllo-inositol by treating "myo-inositol" with a microorganism producing NAD<sup>+</sup>-independent myo-inositol 2-dehydrogenase and thus performing an oxidation reaction. Therefore, performing an oxidation reaction by treating "myo-inositol" with NAD<sup>+</sup>-independent myo-inositol 2-dehydrogenase or a microorganism producing the same cannot be recognized as a special technical feature making a contribution over prior art. (Continued to extra sheet.)

1. ☒ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
  
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☒ No protest accompanied the payment of additional search fees.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2004/015174

Continuation of Box No.III of continuation of first sheet(2)

Thus, it does not appear that there is a technical relationship among the inventions as set forth in claims 1 and 10 to 15 as described above expressed by the same or corresponding special technical features.

Such being the case, the inventions as set forth in claims 1 and 10 to 15 are not considered as relating to a group of inventions so linked as to form a single general inventive concept.

The matter common to claims 1 and 35 to 43 resides in being a process for producing scyllo-inositol. As described in, for example, JP 2003-102492 A, however, a process for producing scyllo-inositol has been already known. Thus, production of scyllo-inositol cannot be recognized as a technical feature making a contribution over prior art.

Thus, it does not appear that there is a technical relationship among the inventions as set forth in claims 1 and 35 to 43 as described above expressed by the same or corresponding special technical features.

Such being the case, the inventions as set forth in claims 1 and 35 to 43 are not considered as relating to a group of inventions so linked as to form a single general inventive concept.

The same applies to the inventions as set forth in claim 1 and 44 to 46.

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>1</sup> C12P7/18, C12N1/20, C12N9/04, C12P7/26, C12N15/53, C12N1/21, C07C35/16 //(C12P7/18, C12R1:02)

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>1</sup> C12P7/18, C12N1/20, C12N9/04, C12P7/26, C12N15/53, C12N1/21, C07C35/16

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

Genbank/EMBL/DDBJ/Swissprot/PIR/Geneseq  
WPIDS/BIOSIS/BIOTECHABS/CA (STN)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
<u>X</u> A	Wood D.W. et al., The genome of the natural genetic engineer <i>Agrobacterium tumefaciens</i> C58, Science, 2001, Vol. 294, p. 2317-2323	19-23 1-18, 24-46
A	JP 2003-102492 A (北興化学工業株式会社) 2003.04.08 (ファミリーなし)	1-46
A	JP 9-140388 A (北興化学工業株式会社) 1997.06.03 (ファミリーなし)	1-46

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

04.01.2005

国際調査報告の発送日

25.1.2005

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

深草 亜子

4 B

9548

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) : 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	JP 60-248637 A (メルク・パテント・ゲゼルシャフト・ミット・ベ シュレンクテル・ハフツング) 1985.12.09 & DE 3405663 A	1-46

## 第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
2. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

## 第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

請求の範囲1及び10-15の共通事項は「ミオーイノシトール」にNAD<sup>+</sup>非依存型ミオーイノシトール2-デヒドロゲナーゼ又はこれを生産する微生物を作用させて酸化反応を行うことであるが、例えば特開2003-102492号公報に記載されているとおり、「ミオーイノシトール」にNAD<sup>+</sup>非依存型ミオーイノシトール2-デヒドロゲナーゼを生産する微生物を作用させて酸化反応を行ってシロイノソースを得ることが知られているから、「ミオーイノシトール」にNAD<sup>+</sup>非依存型ミオーイノシトール2-デヒドロゲナーゼ又はこれを生産する微生物を作用させて酸化反応を行うことを、先行技術に対して貢献する技術的特徴と認めることはできない。

(特別ページに続く)

1. ☒ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- ☒ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

## 第Ⅲ欄の続き

したがって、上記の請求の範囲 1 及び 10-15 に係る発明は相互に同一の又は対応する特別の技術的特徴によって表現された技術的相互関連性を有しているとは認められない。

よって、請求の範囲 1 及び 10-15 に係る発明は単一の一般的発明概念を形成するように関連している一群の発明とすることはできない。

請求の範囲 1 及び 35-43 の共通事項はシローイノシトールの製造方法であるという点であるが、例えば特開 2003-102492 号公報に記載されているとおり、シローイノシトールの製造方法は既に知られているから、シローイノシトールを製造するということを、先行技術に対して貢献する技術的特徴と認めることはできない。

したがって、上記の請求の範囲 1 及び 35-43 に係る発明は相互に同一の又は対応する特別の技術的特徴によって表現された技術的相互関連性を有しているとは認められない。

よって、請求の範囲 1 及び 35-43 に係る発明は単一の一般的発明概念を形成するように関連している一群の発明とすることはできない。

請求の範囲 1 及び 44-46 に係る発明についても同様である。